

Molekulare Toxikologie von Acrylamid anhand der Analytik von Proteinaddukten

Vom Fachbereich Chemie der Technischen Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

genehmigte Dissertation

(D 386)

vorgelegt von

Staatl.-geprüf.-Lebensmittelchemiker

Daniel Bertow

Betreuer: Prof. Dr. G. Eisenbrand

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 03. Februar 2009

Kaiserslautern 2009

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit entstand zwischen August 2003 und März 2007 im
Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie der
Technischen Universität Kaiserslautern.

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 03.02.2009

Prüfungskommission

Vorsitzender: Prof. Dr. S. Ernst

1. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Eisenbrand

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. D. Schrenk

Ich danke Herrn Prof. Dr. G. Eisenbrand und Herrn Dr. M. Baum für die Überlassung
des Themas sowie für Anregungen und die wohlwollende Unterstützung während der
Promotionszeit.

1	EINLEITUNG	9
2	PROBLEMSTELLUNG	11
3	THEORETISCHE GRUNDLAGEN	14
3.1	Acrylamid	14
3.1.1	Allgemeines	14
3.1.2	Expositionsquellen	14
3.1.3	Expositionsabschätzungen	17
3.1.4	Entstehung von Acrylamid im Lebensmittel	19
3.1.5	Toxikokinetik	22
3.1.6	Toxikodynamik	30
3.1.7	Risikobewertung von Acrylamid	35
3.2	Blut	38
3.2.1	Funktion des Blutes	38
3.2.2	Blutbildung und Zusammensetzung des Blutes	38
3.2.3	Hämoglobin	40
3.3	Biomonitoring	41
3.3.1	Grundlagen	41
3.3.2	Biomarker	43
3.3.3	Quellen von Biomarkern	46
3.3.4	Protein-Addukte	47
3.3.5	DNA-Addukte	50
3.3.6	Biomonitoring von Acrylamid mittels Hämoglobinaddukten	51
3.4	Prinzip der verwendeten Methoden	61
3.4.1	Modifizierter Edman-Abbau	61
3.4.2	Prinzip des Flüssig-Szintillationszählers (LSC)	63
3.4.3	Prinzip der Massenspektrometrie (MS)	63
3.4.4	Prinzip der Kopplung von HPLC und MS	66
3.4.5	Prinzip der Kopplung von GC und MS	68
4	MATERIAL UND METHODEN	70
4.1	Synthese der Pentafluorphenylthiohydantoin-Derivate zur Standardisierung	70
4.1.1	Geräte, Chemikalien und Materialien	70
4.1.2	Synthese von AAVal-PFPTH (1-(2-Aminocarbonylethyl)-(S)-5-isopropyl-3-pentafluorphenyl-2-thiohydantoin)	71
4.1.3	Synthese von AAd ₇ Val-PFPTH (1-(2-Aminocarbonylethyl)-(S)-5-d ₇ -isopropyl-3-pentafluorphenyl-2-thiohydantoin)	72
4.1.4	Synthese von GAd ₇ Val-PFPTH (N-2-Aminocarbonyl-2-hydroxyethyl-L-d ₇ -valyl-pentafluorphenyl-thiohydantoin)	73
4.2	Synthese der Dipeptid-Derivate zur Standardisierung	75
4.2.1	Geräte, Chemikalien und Materialien	75
4.2.2	Synthese von <i>tert</i> -Butoxycarbonyl-L-d ₈ -valin (BOC-L-d ₈ -valin)	76
4.2.3	Synthese von BOC-L-d ₈ -valyl-L-leucin-p-nitroanilid	76
4.2.4	Synthese von L-d ₈ -Valyl-L-leucin-p-nitroanilid	77
4.2.5	Synthese von N-2-Aminocarbonylethyl-L-d ₈ -valyl-L-leucin-p-nitroanilid und N-2-Aminocarbonyl-2-hydroxyethyl-L-d ₈ -valyl-L-leucin-p-nitroanilid	78
4.2.6	Synthese von N-2-Aminocarbonylethyl-L-Valin (AAVal) und N-2-Aminocarbonyl-2-hydroxyethyl-L-Valin (GAVal)	78
4.2.7	Synthese von N-2-Aminocarbonylethyl-L-valyl-L-leucin-p-nitroanilid und N-2-Aminocarbonyl-2-hydroxyethyl-L-valyl-L-leucin-p-nitro-anilid	79

4.3	Modifizierter Edman-Abbau	80
4.3.1	Geräte, Chemikalien und Materialien	80
4.3.2	Durchführung	82
4.4	Ermittlung der <i>in vivo</i> Adduktbildung von Acrylamid und Glycidamid mit dem N-terminalen Valin des Hämoglobins im Rahmen der humanen Verzehrsstudie „Bedeutung der CYP 2E1-Aktivität für die Toxikokinetik von Acrylamid beim Menschen“	92
4.4.1	Design der Studie	92
4.5	Verteilung von ¹⁴C-Acrylamid in humanem Vollblut	95
4.5.1	Geräte, Chemikalien und Materialien	95
4.5.2	Durchführung	96
4.6	Statistische Auswertungen	100
4.6.1	Signifikanzen	100
4.6.2	Ausreißer-Test	100
4.6.3	Statistische Auswertung der Hb-Addukte im Rahmen der Humanverzehrsstudie	101
4.7	Sonstige Berechnungen	103
4.7.1	Berechnung der <i>in vivo</i> Dosis	103
4.7.2	Substanzaufnahme berechnet aus der <i>in vivo</i> Dosis	103
5	ERGEBNISSE UND ERSTE DISKUSSION	104
5.1	Synthese der Pentafluorphenylthiohydantoin-Derivate zur Standardisierung	105
5.1.1	Synthese von AAd ₇ Val-PFPTH (1-(2-Aminocarbonylethyl)-(S)-5-d ₇ -isopropyl-3-pentafluorphenyl-2-thiohydantoin)	105
5.1.2	GAd ₇ Val-PFPTH	107
5.1.3	acGAd ₇ Val-PFPTH	109
5.2	Synthese der Dipeptidderivate zur Standardisierung	110
5.2.1	d ₈ Valyl-leucin-p-nitroanilid	110
5.2.2	AAd ₈ Valyl-leucin-p-nitroanilid	113
5.2.3	GAd ₈ Valyl-leucin-p-nitroanilid	115
5.3	Etablierung der Edmanabbau-Methodik	116
5.3.1	Messung der Pentafluorphenylthiohydantoinderivate von AA und GA mit LC/MS/MS	116
5.3.2	Messung der Pentafluorphenylthiohydantoinderivate von AA und GA mit GC/MS	118
5.3.3	Alternative Probenaufarbeitungsmethoden	120
5.4	Hintergrundbelastung des humanen Blutes mit Acrylamid und Glycidamid	122
5.5	Dosimetrie	124
5.5.1	Dosimetrie der Adduktbildung von AA und GA mit dem N-terminalen Valin des Hämoglobins mittels LC/MS/MS	124
5.5.2	Dosimetrie der Adduktbildung von AA und GA mit dem N-terminalen Valin des Hämoglobins mittels GC/MS	127
5.6	Ermittlung der <i>in vivo</i> Adduktbildung von Acrylamid und Glycidamid mit dem N-terminalen Valin des Hämoglobins im Rahmen der humanen Verzehrsstudie „Bedeutung der CYP 2E1-Aktivität für die Toxikokinetik von Acrylamid beim Menschen“	132
5.6.1	Auswertung der Hämoglobinadduktbildung	132
5.6.2	Statistische Auswertung der Kinetik der <i>in vivo</i> Adduktbildung	139
5.7	Verteilung von ¹⁴C-Acrylamid in humanem Vollblut	146
5.7.1	Einfluss der Matrix auf die Messergebnisse	146
5.7.2	Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der ¹⁴ C-AA-Verteilung in humanem Vollblut	147
5.7.3	Verteilung von ¹⁴ C-Acrylamid im Humanblut bei Auftrennung der Erythrozytenfraktion	152
6	DISKUSSION	154

6.1	Etablierung von Methoden zur Messung der Adduktbildung von Acrylamid und Glycidamid am N-terminalen Valin des Hämoglobins	154
6.2	Untersuchungen zur Hintergrundbelastung von Rauchern und Nichtrauchern durch Acrylamid und Glycidamid in Form von Hämoglobinaddukten	157
6.3	Betrachtung der Dosimetrie der Adduktbildung von Acrylamid und Glycidamid am N-terminalen Valin des Hämoglobins unter Berücksichtigung des genotoxischen Potentials	160
6.4	Effizienz der Adduktbildung von Acrylamid und Glycidamid am N-terminalen Valin des Hämoglobins	161
6.5	Diskussion der <i>in vivo</i> Ergebnisse aus der humanen Verzehrstudie mit Acrylamid	164
6.6	Diskussion der Ergebnisse aus den Verteilungsversuchen mit ¹⁴ C-Acrylamid	170
7	ZUSAMMENFASSUNG	173
8	LITERATUR	175

Abkürzungen

AA	Acrylamid
AA _{d7} Dip	Acrylamiddipeptid (siebenfach deuteriert)
AAMA	N-acetyl-S-(2-aminocarbonylethyl)-cystein
AAVal	Acrylamid-valin
AAValPFPTH	Acrylamid-valin-pentafluorphenylthiohydantoin
AA _{d7} ValPFPTH	Acrylamid-valin-pentafluorphenylthiohydantoin (siebenfach deuteriert)
ABT	1-Aminobenzotriazol
acGA _{d7} ValPFPTH	acetonisiertes Glycidamid-valin-pentafluorphenylthiohydantoin (siebenfach deuteriert)
3-APA	3-Aminopropionamid
APCI	„atmospheric pressure chemical ionisation“, engl. für chemische Ionisation bei Atmosphärendruck
API	„atmospheric pressure ionisation“, engl. für Ionisation bei Atmosphärendruck
AS	Aminosäure
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
bidest.	bidestilliert
Bq	Bequerel
BVL	Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
BW	Blindwert
CA	Chromosomale Aberration
cpm	counts per minute
CYP	Cytochrom-P450 abhängige Monooxygenase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„desoxyribonucleic acid“, engl. für Desoxyribonukleinsäure
dpm	disintegrations per minute
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESI	Electrospray Ionisation
FE	Flächeneinheiten
FEI	Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V.
FPG	Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase
GA	Glycidamid
GA _{d7} Dip	Glycidamiddipeptid (siebenfach deuteriert)
GAMA	N-acetyl-S-(2-aminocarbonyl-2-hydroxyethyl)-cystein
GAVal	Glycidamid-valin
GAValPFPTH	Glycidamid-valin-pentafluorphenylthiohydantoin
GA _{d7} ValPFPTH	Glycidamid-valin-pentafluorphenylthiohydantoin (siebenfach deuteriert)
GC	Gaschromatographie bzw. Gaschromatograph
GC/MS	Gaschromatographie/ Massenspektrometrie
GSH	Glutathion (reduziert)
GSSG	Glutathion (oxidiert)
GST	Glutathion-S-Transferasen

Abkürzungsverzeichnis

Hb	Hämoglobin
HGB	Hintergrundbelastung
HPLC	“High performance (pressure) liquid chromatography”, engl. für Hochleistungs(druck)flüssigkeitschromatographie
HSAB	Hard-Soft-Acid-Base Konzept nach Pearson
IARC	International Agency for Research on Cancer
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
KG	Körpergewicht
LC/MS	“liquid chromatography/ mass spectrometry”, engl. für Flüssigchromatographie/ Massenspektrometrie
LSC	Flüssig-Szintillationszähler (Liquid Scintillation Counter)
MALDI	matrix assisted laser desorptions ionisation
MRM	Multiple Reaction Monitoring
n	Anzahl unabhängiger Versuche
NMR	“nuclear magnetic resonance”, engl. für Kernspinresonanz
NP	normal phase
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
p	Irrtumswahrscheinlichkeit (Statistik)
p.a.	pro analysi = analysenrein
PFPITC	Pentafluorphenylisothiocyanat
PFPTH	Pentafluorphenylthiohydantoin
pH	negativer dekadischer Logarithmus d. Wasserstoffionenkonzentration
pK _a	Logarithmus der Säuredissoziationskonstante
Q	Quadrupol
RP	reversed phase
RT	Retentionszeit
SCE	„sister chromatid exchange“, engl. für Schwesterchromatidaustausch
SD	„standard deviation“, engl. für Standardabweichung
SDS	„sodium dodecyl sulfate“, engl. für Natriumdodecylsulfat
SE	„standard error“, engl. für Standardfehler
SIM	„selected ion monitoring“, engl. für Einzelmassen-Registrierung
TEA	Triethanolamin
THF	Tetrahydrofuran
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenverhältnis
WHO	World Health Organization

1 Einleitung

Neue Entwicklungen in analytischen Techniken für die Detektion und Quantifizierung der Adduktbildung von chemischen Kanzerogenen mit Makromolekülen wie DNA und Proteinen ermöglichten die Entdeckung, dass als nicht-exponiert betrachtete Individuen sogenannte „Hintergrundbelastungen“ mit chemischen Kanzerogenen in Form von Addukten aufweisen [Watson und Mutti, 2004]. Das toxikologische Interesse an der Substanz Acrylamid erfuhr eine deutliche Steigerung in der Folge des Unfalls im schwedischen Hallandsås-Tunnel im Jahr 1997, bei dem durch unvollständige Polymerisierung einer acrylamidhaltigen Dichtungsmasse große Mengen des Monomers in die Umwelt gelangten. Die Beobachtung, dass im Rahmen der Untersuchung des Blutes der beteiligten Tunnelarbeiter das spezifische Addukt von Acrylamid mit dem N-terminalen Valin des Hämoglobin auch in der nicht-exponierten Kontrollgruppe nachgewiesen wurde, sowie bei Fütterungsversuchen mit Ratten generiert wurde, führte zu der Entdeckung, dass bestimmte erhitzte Lebensmittel eine Expositionsquelle für Acrylamid darstellen [Tareke *et al.*, 2000, Tareke *et al.*, 2002]. Im Herbst 2002 wurde gezeigt, dass Acrylamid im Verlauf der Maillard-Reaktion aus Aminosäuren, vorwiegend Asparagin, und reduzierenden Zuckern entsteht [Mottram *et al.*, 2002, Stadler *et al.*, 2002]. Die WHO beziffert den Bereich der weltweit durchschnittlichen lebensmittelbedingten Exposition der allgemeinen Bevölkerung mit 0,3-0,8 µg Acrylamid/kg KG/Tag [WHO, 2002].

Acrylamid zeigt ein neurotoxisches Potential, für das die WHO 2002 auf der Basis bisheriger Tierversuche einen NOAEL von 0,5 mg/kg KG/Tag festgelegt hat. Für die reproduktionstoxischen Effekte von Acrylamid bestimmte die WHO einen NOAEL von 2 mg/kg KG/Tag [WHO, 2002]. Das komplexe Muster der Ergebnisse der Genotoxizitätsstudien von Acrylamid resultiert aus dem Zusammenwirken der biologischen Aktivitäten von Acrylamid selbst, sowie seinem Metaboliten Glycidamid. Diskutiert wird, dass Acrylamid auf Grund der hohen Affinität zur Bildung von Addukten mit Proteinen wie den chromosomalassozierten Proteinen (Protamine) vorzugsweise genotoxische Effekte auf der chromosomalen Ebene verursacht. Glycidamid hingegen zeigt eine hohe Kapazität zur Bindung an die DNA und wirkt dadurch mutagen [Carere, 2006]. Da in Langzeitstudien an Ratten und Mäusen erhöhte Inzidenzen von Tumoren an verschiedenen Organen festgestellt wurden, stufte die IARC Acrylamid als Substanz, die wahrscheinlich kanzerogen am Menschen ist (Kategorie 2A), ein [IARC, 1994]. Epidemiologische Studien lieferten auf Grund methodischer Limitierungen bisher keine Hinweise auf eine kanzerogene

Wirkung von Acrylamid am Menschen [Collins *et al.*, 1989, Marsh *et al.*, 1999, Sobel *et al.*, 1986]. Ob für das kanzerogene Potential von Acrylamid ein genotoxischer oder ein epigenetischer Mechanismus zutreffend ist, wird weiterhin diskutiert [Carere, 2006, Park *et al.*, 2002, Rice, 2005].

Acrylamid kann in Folge einer oralen, dermalen oder inhalativen Exposition in den Organismus gelangen und verteilt sich auf Grund seiner guten Wasserlöslichkeit gleichmäßig auf die Gewebe [Dearfield *et al.*, 1995, IARC, 1994, Sumner *et al.*, 2003]. Der Metabolismus von Acrylamid umfasst verschiedene Reaktionswege. So wird die Oxidation von Acrylamid zu Glycidamid, dem reaktiven Epoxidmetaboliten, primär durch Cytochrom P450 2E1 katalysiert [Calleman *et al.*, 1990, Sumner *et al.*, 1999]. Desweiteren können Acrylamid sowie Glycidamid mit nukleophilen Zentren in Makromolekülen reagieren [Bergmark *et al.*, 1991, Friedman, 2003]. Wichtige Entgiftungsreaktionen im Menschen stellen die Konjugation mit Glutathion (GSH) dar, die zu der Ausscheidung von Acrylamid und Glycidamid in Form ihrer Mercaptursäuren AAMA und GAMA im Urin führt sowie die Hydrolyse von Glycidamid zu Glyceramid [Miller *et al.*, 1982, Sumner *et al.*, 1992].

Von großer Bedeutung für die Bewertung der inneren Exposition durch alkylierende Substanzen wie Acrylamid und Glycidamid sind analytische Methoden, welche die Addukte mit körpereigenen Makromolekülen wie dem roten Blutfarbstoff Hämoglobin spezifisch bestimmen können [Bergmark *et al.*, 1991, Tornqvist *et al.*, 2002]. Hämoglobin eignet sich auf Grund seiner Lebensdauer von ca. 120 Tagen besonders zum Biomonitoring von chronischen Expositionen [Tornqvist *et al.*, 2002, Watson und Mutti, 2004]. Eine besondere analytische Bedeutung kommt dabei der Bestimmung von Addukten mit dem N-terminalen Valin des Hämoglobins zu [Bergmark *et al.*, 1993, Marquardt und Schäfer, 2004, Tornqvist *et al.*, 2002]. Neben Publikationen, welche die Level der Biomarker AAVal und GAVal im Blut der allgemeinen Bevölkerung sowie in beruflich exponierten Personen erfassen [Bader, 2005, Bergmark, 1997, Bergmark *et al.*, 1993, Hagmar *et al.*, 2001, Paulsson *et al.*, 2006, Schettgen *et al.*, 2004b, Vesper *et al.*, 2006], liegen auch bereits Ergebnisse aus humanen Verzehrstudien vor, die einen dosisabhängigen Anstieg von AAVal und GAVal aufzeigen [Fennell *et al.*, 2005, Fuhr *et al.*, 2006, Vesper *et al.*, 2005]. Auf der Basis der effektiven inneren Dosis und weitergehenden toxikologischen Untersuchungen ist es möglich die aus einer Exposition resultierenden Gesundheitsrisiken für die Allgemeinbevölkerung bzw. speziell exponierten Gruppen abzuschätzen [Dybing und Sanner, 2003, Umweltbundesamt, 2008].

2 Problemstellung

Ein Ziel dieser Arbeit ist es, auf der Basis einer Biomarker-gestützten Dosimetrie genotoxische Effekte in Humanblut zu erfassen und die Basis zur Risikobewertung von Acrylamid zu verbessern.

Acrylamid, ein sog. „Food born toxicant“, entsteht beim Erhitzen von stärkehaltigen Lebensmitteln [Tareke *et al.*, 2002]. Basierend auf den Beobachtungen in Langzeitstudien an Ratten und Mäusen, in denen erhöhte Inzidenzen von Tumoren an verschiedenen Organen festgestellt wurden, stuft die IARC Acrylamid als Substanz ein, die wahrscheinlich kanzerogen am Menschen ist (Kategorie 2A) [IARC, 1994]. Es ist bekannt, dass Acrylamid sowie sein Metabolit Glycidamid im Organismus mit nukleophilen Zentren reagieren, zu denen auch kritische Strukturen wie die DNA gehören [Gamboa da Costa *et al.*, 2003, Segerback *et al.*, 1995]. Zur Bewertung der aus einer Exposition mit Acrylamid resultierenden Gesundheitsrisiken für die Allgemeinbevölkerung ist es wichtig, die effektive innere Dosis von Acrylamid und Glycidamid zu erfassen [Dybing und Sanner, 2003]. Durch die gute Korrelation zwischen der Exposition mit Acrylamid bzw. Glycidamid und der Adduktbildung mit dem N-terminalen Valin des Hämoglobins sind die Hämoglobinaddukte als Biomarker zur Erfassung der inneren Exposition gut geeignet [Tornqvist *et al.*, 2002]. Ein für die Risikobewertung wichtiger Aspekt ist die vergleichende Bewertung der Bildungkinetik von Hämoglobinaddukten mit jener der DNA-Addukte [Tareke *et al.*, 2006].

Das Ziel dieser Arbeit, neue Erkenntnisse über die Effizienz der Adduktbildung von Acrylamid und Glycidamid mit Proteinen zu gewinnen, umfasste die folgenden Aspekte:

- Den Biomarkern AAVal und GAVal kommt für die präzise und spezifische Quantifizierung der Adduktbildung von Acrylamid und Glycidamid mit dem N-terminalen Valin des Hämoglobin eine wichtige Bedeutung zu. AAVal und GAVal werden in dem Medium Blut bestimmt, das *in vivo* bei der oralen Aufnahme von Acrylamid über die Nahrung als erstes Kompartiment des Körpers exponiert wird und darüber hinaus den Vorteil einer guten analytischen Zugänglichkeit besitzt.
- Zur Quantifizierung von AAVal und GAVal mit Hilfe des modifizierten Edman-Abbaus müssen die benötigten Standardsubstanzen, die Pentafluorphenylthiohydantoin-Derivate AAd₇Val-PFPTH und GAd₇Val-PFPTH, synthetisiert und charakterisiert werden. Die Etablierung und Validierung geeigneter

LC/MS/MS- und GC/MS-Methoden ist eine wesentliche Voraussetzung für die Erfassung der Addukte im Spurenbereich.

- Um die Anwendbarkeit der etablierten Methodik zu überprüfen und die Ergebnisse mit denen anderer Arbeitsgruppen zu vergleichen, werden die Hintergrundbelastungen an AAVal und GAVal in Blutproben von (nicht-) rauchenden Spendern der allgemeinen Bevölkerung bestimmt. Die Hintergrundbelastung reflektiert die chronische Exposition mit Acrylamid und Glycidamid über einen Zeitraum von 4 Monaten.
- Um die Kinetik der im humanen Blut ablaufenden Reaktion von Acrylamid und Glycidamid mit Hämoglobin zu untersuchen, sollen *in vitro* Inkubationsversuche mit humanem Vollblut durchgeführt werden. Die relative Reaktivität von Acrylamid und Glycidamid gegenüber dem N-terminalen Valin des Hämoglobins ist eine wichtige Voraussetzung für die Interpretation der Hintergrundbelastungen durch AAVal und GAVal, auch im Hinblick auf eine Herleitung der Umwandlungsrate von Acrylamid zu Glycidamid aus dem relativen Verhältnis von GAVal zu AAVal. Dazu ist es nötig eine sensitive *in vitro* Dosimetrie oberhalb der Bestimmungsgrenze der chromatographisch-massenspektrometrischen Methodik zur Untersuchung der Kinetik dieser Reaktionen durchzuführen. Die Adduktbildung wird durch Inkubation von frisch entnommenem Humanblut mit verschiedenen Konzentrationen von Acrylamid und Glycidamid untersucht. Die Kinetik der Hämoglobinadduktbildung von Acrylamid und Glycidamid soll mit der Kinetik von DNA-Schäden, die mit Hilfe des Comet-Assays erfasst wurden [Thielen, 2008], verglichen werden.
- Als Probenaufarbeitungstechniken sollen Festphasenextraktion und Wasserdampfdistillation mit der Zielsetzung einer deutlichen Matrixreduktion geprüft werden.
- Um die Effizienz der Derivatisierung von AAVal und GAVal zu erfassen, ist die Verwendung von PFPTH-Standardsubstanzen nicht geeignet. Daher sollte um die Effizienz der Derivatisierung zu PFPTH-Derivaten analytisch miterfassen zu können, die Verwendung von Peptidstandardsubstanzen, die ebenfalls den Derivatisierungsschritt durchlaufen, eine Alternative entwickelt werden. Dazu sollen zunächst geeignete Dipeptid-Standardsubstanzen synthetisiert und charakterisiert werden. Die Effizienz des Derivatisierungsschrittes kann durch einen Vergleich beider Standardisierungstechniken ermittelt werden.

- Die Verteilung von Acrylamid in den Kompartimenten des humanen Vollblutes liefert Informationen über das Ausmaß der Bindung von Acrylamid an Makromoleküle. Dazu soll humanes Vollblut mit verschiedenen Konzentrationen von ^{14}C -radiomarkiertem Acrylamid inkubiert werden. Für die Auftrennung des Blutes im Halbmikromaßstab und die Auswertung ist ein geeignetes Verfahren zu entwickeln.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss der CYP 2E1-Aktivität auf die Bildung der Hämoglobinaddukte *in vivo* zu untersuchen. Dies geschieht im Rahmen einer Humanstudie, welche zum Ziel hat, erstmalig den Einfluss der CYP 2E1-Aktivität auf die Toxikokinetik von Acrylamid und seinem Metaboliten Glycidamid, AAMA und GAMA im Plasma bzw. Urin sowie der Hämoglobinaddukte im Menschen zu untersuchen. Durch Identifikation und Quantifizierung der möglichen Einflussfaktoren auf die Toxikokinetik von Acrylamid sollen Grundlagen für eine individuelle Risikoabschätzung nach einer Exposition mit Acrylamid-haltigen Lebensmitteln geschaffen werden [Doroshenko *et al.*, 2008].

- Die Biomarker AAVal und GAVal sollen mit Hilfe der etablierten Methodik des modifizierten Edman-Abbaus in dem Blut von ausgewählten Probanden der Studie zu sämtlichen Blutentnahmezeitpunkten bestimmt werden. Dabei soll zunächst die Frage geklärt werden, ob eine einmalige Dosis von 1 mg Acrylamid überhaupt mit den Biomarkern AAVal und GAVal zu erfassen ist. Wenn möglich soll der zeitliche Verlauf der AAVal- und GAVal-Bildung und ein möglicher individueller Einfluss sowohl der Hemmung von CYP 2E1 durch Disulfiram, als auch eine Induktion von CYP 2E1 durch Vorbehandlung mit Ethanol auf die Entwicklung der Hämoglobinadduktlevel untersucht werden. Dadurch sollen Rückschlüsse auf die Rolle der CYP 2E1-Aktivität auf die Toxikokinetik von Acrylamid in Bezug auf die Adduktbildung am Hämoglobin ermöglicht werden.
- Mit Hilfe einer geeigneten statistischen Bewertung der Daten soll die statistische Signifikanz von eventuell zu beobachtenden Effekten belegt werden.

3 Theoretische Grundlagen

3.1 Acrylamid

3.1.1 Allgemeines

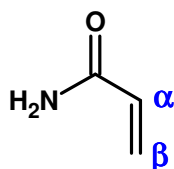


Abbildung 1: Strukturformel von Acrylamid

Acrylamid ist eine α -, β -ungesättigte Carbonylverbindung, die erstmalig 1949 synthetisiert wurde. Verwendung findet Acrylamid fast ausschließlich in der Produktion von Polyacrylamiden, die vor allem in der Abwasseraufbereitung, in der Papier- und Zellstoffverarbeitung, in der Mineralölaufbereitung sowie im Laborbereich zur Herstellung von Gelen für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) eingesetzt werden. Da Polyacrylamide auch als Zusatzstoffe in Kosmetika und in Farben eingesetzt werden, kann der Gehalt an Restmonomeren von besonderer toxikologischer Relevanz sein.

Acrylamid hat ein Molekulargewicht von 71,06 g/mol und liegt bei Normaltemperatur in Form eines weißen, kristallinen Pulvers vor, das oberhalb des Schmelzpunktes von 84 °C die Tendenz zur Polymerisierung zeigt. [Friedman, 2003]

Die International Agency for Research on Cancer (IARC) hat Acrylamid als „wahrscheinlich kanzerogen beim Menschen“ (Gruppe 2A) eingestuft. Neurotoxische und reproduktionstoxische Eigenschaften des Acrylamids sind ebenfalls bekannt. [IARC, 1994]

3.1.2 Expositionsquellen

Neben der beruflichen bedingten Exposition durch Acrylamid existieren weitere Expositionsquellen. In der Folge des Unglücks im schwedischen Hallandsås-Tunnel im Jahr 1997 wurde entdeckt, dass bestimmte Lebensmittel eine wichtige Expositionsquelle für Acrylamid darstellen. Insbesondere erhitzte, kohlenhydratreiche Lebensmittel wie Pommes frites oder Kartoffelchips weisen hohe Gehalte an

Acrylamid auf [Tareke *et al.*, 2000, Tareke *et al.*, 2002]. Auch Kaffee hat, bedingt durch seine hohe durchschnittliche Verzehrsmenge von ca. 0,4 L/Tag (3-4 Tassen/Tag), einen deutlichen Anteil (13 %) an der Acrylamid-Exposition über Lebensmittel [Boon *et al.*, 2005]. Die individuelle Belastung durch Lebensmittel innerhalb der Bevölkerung variiert auf Grund von individuellen Verzehrsgewohnheiten sowie Unterschieden in den Acrylamidgehalten verschiedener Produkte erheblich. Dies spiegelt sich auch in der Varianz der Ergebnisse von Bestimmungen der Hämoglobinaddukte von Acrylamid wider [Bader, 2005, Schettgen *et al.*, 2004b]. Für verschiedene Lebensmittelgruppen wurden vom Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM) of the European Commission's Directorate General Joint Research Centre (JRC) u.a. folgende Acrylamidgehalte ermittelt (Tabelle 1). Die Datenbank enthält ca. 3500 Acrylamidgehalte, die hauptsächlich in Deutschland, den Niederlanden, Irland, Griechenland, Österreich und Großbritannien im Zeitraum von April 2003 bis Mai 2004 ermittelt wurden [Boon *et al.*, 2005].

Tabelle 1: Acrylamidgehalte verschiedener Lebensmittelgruppen aus der IRMM-Datenbank in µg/kg Produkt [Boon *et al.*, 2005]

Lebensmittelgruppen	Anzahl Proben	Mittelwert (SD)	Median	Range
Kekse	545	269 (346)	150	< 10-3324
Brot	67	25 (13)	15	< 30-70
Frühstückscerealien	178	104 (135)	56	< 10-846
Kaffee	102	13 (6)	12	4-45
Kartoffelchips	557	766 (559)	602	< 10-3770
Lebkuchen	281	583 (874)	300	< 10-7834
frittierte Kartoffelprodukte	330	424 (498)	240	< 10-3260
Knäckebrot	285	408 (471)	225	< 10-2838

Um die Belastung der Verbraucher mit Acrylamid durch Lebensmittel so weit wie möglich zu reduzieren, hat das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) ein

dynamisches Konzept zur Minimierung von Acrylamid entworfen. Hersteller von Produkten, die in ihrer Warengruppe zu den 10 Prozent mit den höchsten Acrylamidgehalten gehören (der unterste Acrylamidwert dieser 10 Prozent am höchsten belasteten Lebensmittel wird als Signalwert festgelegt), werden von den Überwachungsbehörden vorrangig kontaktiert, um die schnellstmögliche Reduzierung der Acrylamidgehalte zu erreichen. Entsprechendes gilt für alle Produkte, die mehr als 1000 µg Acrylamid je kg Lebensmittel enthalten [BfR, 2003a]. Die Effizienz dieses Konzeptes ist in Tabelle 2 wiedergegeben.

Tabelle 2: Entwicklung der Acrylamidgehalte in Lebensmitteln als Ergebnis des Minimierungskonzeptes [www.bvl.bund.de]

Warengruppe	3. Signalwert-Berechnung 28.11.2003 Median [Acrylamid in µg/kg]	4. Signalwert-Berechnung 17.11.2004 Median [Acrylamid in µg/kg]	5. Signalwert-Berechnung 21.10.2005 Median [Acrylamid in µg/kg]	6. Signalwert-Berechnung 04.01.2007 Median [Acrylamid in µg/kg]	7. Signalwert-Berechnung 23.01.2008 Median [Acrylamid in µg/kg]
Getreideprodukte:					
Knäckebrot	251	340	276	289	311
Frühstückscerealien	35	40	50	-	28
Feine Backwaren aus Mübeteig	104	136	118	139	50
Dauerbackwaren für Diabetiker	551	189	186	187	225
Zwieback oder Kekse für Säuglinge und Kleinkinder	105	73	81	80	88
Lebkuchen und lebkuchenhaltige Gebäcke	430	251	233	348	319
Spekulatius	269	181	230	142	132
Kartoffelprodukte:					
Kartoffelchips	556	385	363	386	394
Pommes frites, zubereitet	195	171	212	193	227
Kartoffelpuffer	308	341	675	452	384
Kaffeeprodukte:					
Kaffee, geröstet	276	277	268	166	195
Kaffee, löslich	732	852	857	904	836
Kaffeersatz	852	872	710	511	540

Eine weitere wichtige Expositionsquelle für Acrylamid stellt Tabakrauch dar. So wurde gezeigt, dass sich durch das Rauchen von Tabakprodukten der Gehalt der Hämoglobinaddukte von Acrylamid um ca. 6 pmol/g Globin pro Zigarette und Tag erhöht [Bergmark, 1997, Schettgen *et al.*, 2004b]. Im gefilterten Hauptstrom einer Zigarette wurden 1,1-2,3 µg Acrylamid nachgewiesen [Smith *et al.*, 2000].

Im Trinkwasser muss der Acrylamidgehalt gemäß der Trinkwasserverordnung unterhalb der Nachweisgrenze liegen. Die tägliche Exposition über das Trinkwasser wird auf 0,0036 µg/kg KG geschätzt und wird als vernachlässigbar gering bewertet [EuropeanCommision, 2002].

Kosmetika, die Polyacrylamid enthalten, können als Verunreinigung auch Spuren des Monomers Acrylamid aufweisen. Nach der Kosmetikverordnung darf der Restgehalt für Acrylamid in Polyacrylamid bei Körperpflegemitteln, die auf der Haut verbleiben, 0,1 mg/kg nicht überschreiten. Bei sonstigen kosmetischen Mitteln ist er auf 0,5 mg/kg beschränkt [BfR, 2003b]. Schätzungen zufolge nehmen Frauen

durchschnittlich täglich $2,3 \times 10^{-4} \mu\text{g AA/kg KG}$ und Männer $1,7 \times 10^{-4} \mu\text{g AA/kg KG}$ über Kosmetika auf, so dass Kosmetika ebenfalls als eine vernachlässigbare Quelle für Acrylamid betrachtet werden [Van Landingham *et al.*, 2004]. Der Übergang („Carry-Over“) von Acrylamid über Futtermittel in das Gewebe (Fleisch, Leber), Milch und Eier landwirtschaftlicher Nutztiere stellt ebenfalls keine relevante Expositionsquelle für den Menschen dar [Kienzle *et al.*, 2005, Pabst *et al.*, 2005].

Es wurde nachgewiesen, dass die mögliche Depolymerisation von Polyacrylamiden aus der Landwirtschaft als Kontamination in Lebensmitteln während eines Erhitzungsprozesses keine signifikanten Mengen Acrylamid freisetzt [Ahn und Castle, 2003].

3.1.3 Expositionsabschätzungen

Die über Lebensmittel aufgenommenen Mengen von Acrylamid variieren stark innerhalb der Bevölkerung auf Grund unterschiedlicher Acrylamidgehalte in den Lebensmitteln sowie unterschiedlicher Verzehrsgewohnheiten. Die Weltgesundheitsorganisation WHO beziffert den Bereich der durchschnittlichen lebensmittelbedingten Exposition von Acrylamid mit $0,3\text{-}0,8 \mu\text{g/kg KG}$ [WHO, 2002]. Das Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) schätzt die durchschnittliche Acrylamid-Aufnahme der Bevölkerung zwischen $0,3$ und $2,0 \mu\text{g/kg KG}$, für die Konsumenten im Perzentil 90 bis 97,5 % sogar zwischen $0,6$ und $3,5 \mu\text{g/kg KG}$ [WHO, 2005]. Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) schätzt die tägliche Belastung durch Acrylamid in Lebensmitteln für den durchschnittlichen Verbraucher in Deutschland auf ungefähr $0,57 \mu\text{g/kg KG}$. Basis für diese Abschätzung war die Verknüpfung der von der deutschen Lebensmittelüberwachung gemessenen Acrylamidgehalte verschiedener Produktgruppen mit den Daten einer nationalen Verzehrstudie der späten 1980er Jahre. Die Acrylamidaufnahme für Personen mit verstärktem Verzehr hoch belasteter Lebensmittel kann jedoch mehrfach höher liegen [Madle *et al.*, 2003]. Kinder im Alter von 4 bis 6 Jahren gehören zu der am höchsten mit Acrylamid belasteten Gruppe. Sie nehmen täglich durchschnittlich über $1,2 \mu\text{g Acrylamid/kg KG/Tag}$ durch die betrachteten hochbelasteten Lebensmittel auf, bei Jugendlichen sind es im Durchschnitt täglich $0,9 \mu\text{g/kg KG/Tag}$. Im Winter 2002 hatte das BfR Daten zur Aufnahme von Acrylamid aus hochbelasteten Nahrungsmitteln bei über 1.000 15- bis 18jährigen Schülerinnen und Schülern der 10. Jahrgangsstufe in Berlin erhoben. Dabei zeigte sich, dass täglich 5% der Schüler mehr als $3,4 \mu\text{g Acrylamid/kg KG}$, 1% mehr als $6,9 \mu\text{g/kg KG}$

aufnahmen [BfR, 2003a]. Mestdagh et al. untersuchten den Einfluss von Kantinenessen auf die Aufnahme von Acrylamid. Unter Verwendung von Verzehrsprotokollen von 160 Personen und Daten über Acrylamidgehalte in Lebensmitteln aus der European Monitoring Database sowie eigenen Bestimmungen des Acrylamidgehaltes der tatsächlich verzehrten Pommes frites, lieferte die Studie eine Median-Aufnahme von 0,4 µg Acrylamid/kg KG/Tag. Dabei wurde gezeigt, dass ein großer Anteil (42,2%) des täglich aufgenommenen Acrylamids über Zwischenmahlzeiten aufgenommen wird. Die Hauptexpositionsquellen waren Kekse (35,4%), Pommes frites (29,9%), Brot (23,5%) und Schokolade (11,2%) [Mestdagh et al., 2007].

3.1.4 Entstehung von Acrylamid im Lebensmittel

Es sind verschiedene prinzipielle Bildungswege von Acrylamid in Lebensmitteln in der Literatur beschrieben. Tareke *et al.* zeigten 2002, dass die Zusammensetzung sowie die Erhitzungsart des Lebensmittels einen Einfluss auf den Gehalt von Acrylamid im Lebensmittel hat. Besonders hohe Acrylamidgehalte weisen kohlenhydratreiche, stark erhitzte Lebensmittel auf [Tareke *et al.*, 2002]. Der quantitativ vorrangige Mechanismus geht von der Bildung von Acrylamid als ein Nebenprodukt der Maillard-Reaktion zwischen Aminosäuren und reduzierenden Zuckern aus. Die höchsten Acrylamidgehalte werden in Anwesenheit von Asparagin erhalten. Auch Methionin und Glutamin generieren Acrylamid [Mottram *et al.*, 2002, Stadler *et al.*, 2002]. Modellstudien haben gezeigt, dass Fructose im Vergleich zu Glucose zur Bildung größerer Mengen Acrylamid führt [Becalski *et al.*, 2003, Taeymans *et al.*, 2005]. Bei der Reaktion von Asparagin und einer Carbonylquelle führt der Bildungsmechanismus über die Schiffsche Base zu Azomethinylid. Alternativ kann die Schiffsche Base auch über eine intramolekulare Cyclisierung (Oxazolidin-5-on-Intermediat) in Azomethinylid umgewandelt werden (Abbildung 2). Die Art des Carbonyls kann die Entstehung des Acrylamids maßgeblich beeinflussen, besonders die funktionelle Gruppe in β -Position zum Stickstoffatom. In Gegenwart einer Hydroxylgruppe (aus der Carbonylquelle) in dieser Position wird die Umlagerung in das korrespondierende decarboxylierte Amadoriprodukt favorisiert, das Acrylamid über eine α,β -Eliminierungsreaktion freisetzt. Die Schiffsche Base führt auch im Fall der Reaktion von Asparagin mit Dicarbonylverbindungen über eine Decarboxylierung zum Azomethinylid (Abbildung 3). Nach Umwandlung in die Iminform kann Acrylamid direkt (bisher nur hypothetisch) oder über 3-Aminopropionamid (3-APA) freigesetzt werden. Bei der Bildung von Acrylamid aus Asparagin sind α -Hydroxycarbonyle deutlich effektiver als Dicarbonylverbindungen [Stadler *et al.*, 2004, Yaylayan *et al.*, 2003, Zyzak *et al.*, 2003]. Die Oxidierung des zunächst entstehenden Glycosylamins in ein Oxo-imin, das schließlich zu 3-APA hydrolysiert wird, macht auch Hydroxycarbonylverbindungen zu einer möglichen Quelle von 3-APA. Die wichtige Rolle von 3-APA als Precursor von Acrylamid wurde von Granvogl und Schieberle bestätigt. 3-APA kann als das biogene Amin von Asparagin betrachtet werden und wird auch in rohen Lebensmitteln durch enzymatische Decarboxylierung von Asparagin gebildet. Asparagin kann folglich auch in Abwesenheit reduzierender Zucker Acrylamid bilden. Dies erklärt die Anwesenheit von Acrylamid in fast allen Lebensmitteln, da freies Asparagin in kleinen

Mengen stets vorhanden ist. Jeder Parameter, der die Streckerreaktion zugunsten der Aldehydbildung anstelle von 3-APA verschieben würde, könnte die Acrylamidbildung vermindern [Bagdonaite *et al.*, 2006, Granvogl und Schieberle, 2006]. Einflussgrößen wie der Wassergehalt oder die physikalische Beschaffenheit der Lebensmittelmatrix können den mechanistischen Bildungsweg von Acrylamid beeinflussen [Taeymans *et al.*, 2005]. Im Fall von Lebkuchen, einem Lebensmittel mit besonders hohen Acrylamidgehalten, verminderte der Austausch von Ammoniumhydrogencarbonat mit Natriumhydrogencarbonat die AA-Bildung um $\geq 60\%$. Der Austausch von reduzierenden Zuckern mit Saccharose sowie der Zusatz von organischen Säuren hatten ebenfalls einen positiven Einfluss [Amrein *et al.*, 2004]. Die Reduzierung der Acrylamidbildung bei niedrigen pH-Werten erklärt sich durch die dann vermehrt protoniert vorliegende Aminogruppe des Asparagins, da die nukleophile unprotonierte Form für den ersten Reaktionsschritt der Maillard-Reaktion nötig ist [De Vleeschouwer *et al.*, 2006]. Eine Absenkung der Temperatur bei der Zubereitung von frittierten Kartoffelprodukten von 185 °C auf 175 °C bewirkte bereits eine Verringerung des Acrylamidgehaltes um 35% [Gertz, 2002].

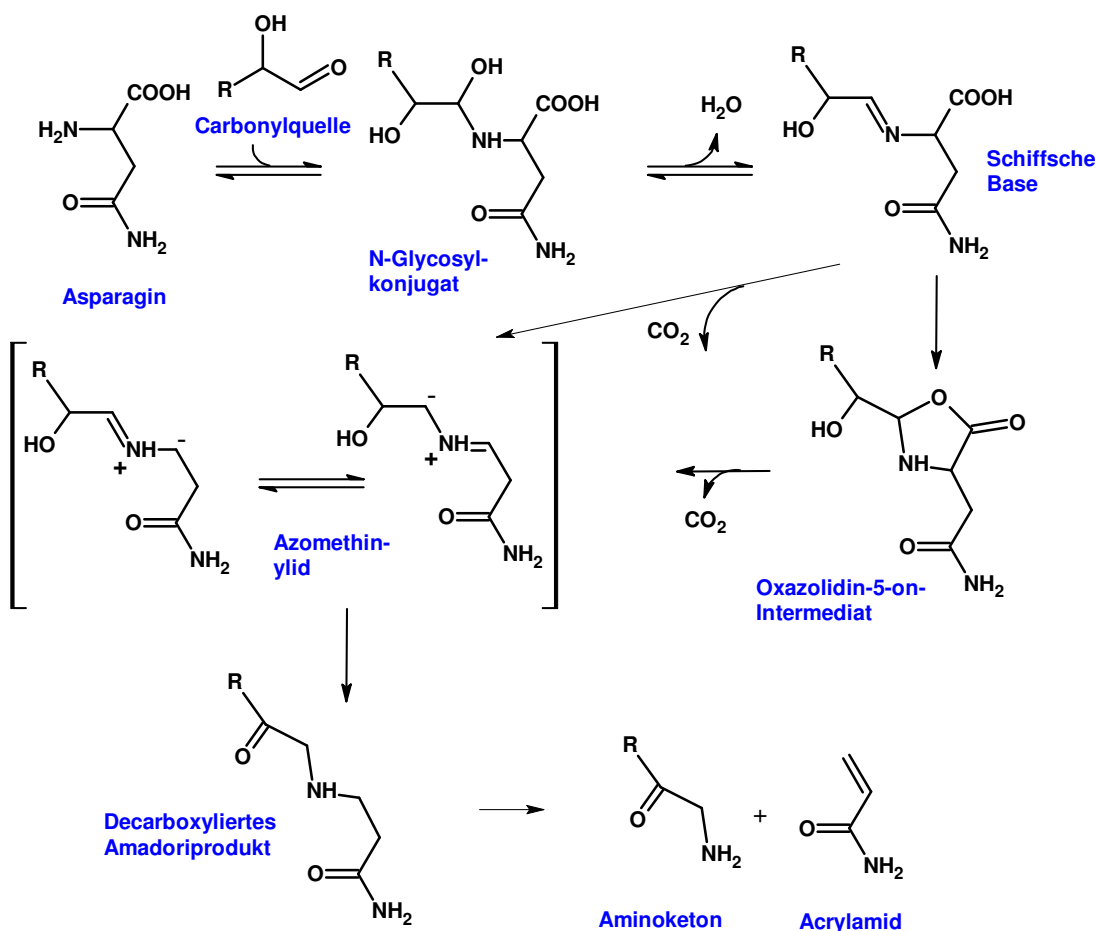


Abbildung 2: Mechanismus der Acrylamidbildung aus Asparagin und einer Carbonylquelle [Stadler *et al.*, 2004, Yaylayan *et al.*, 2003, Zyzak *et al.*, 2003]

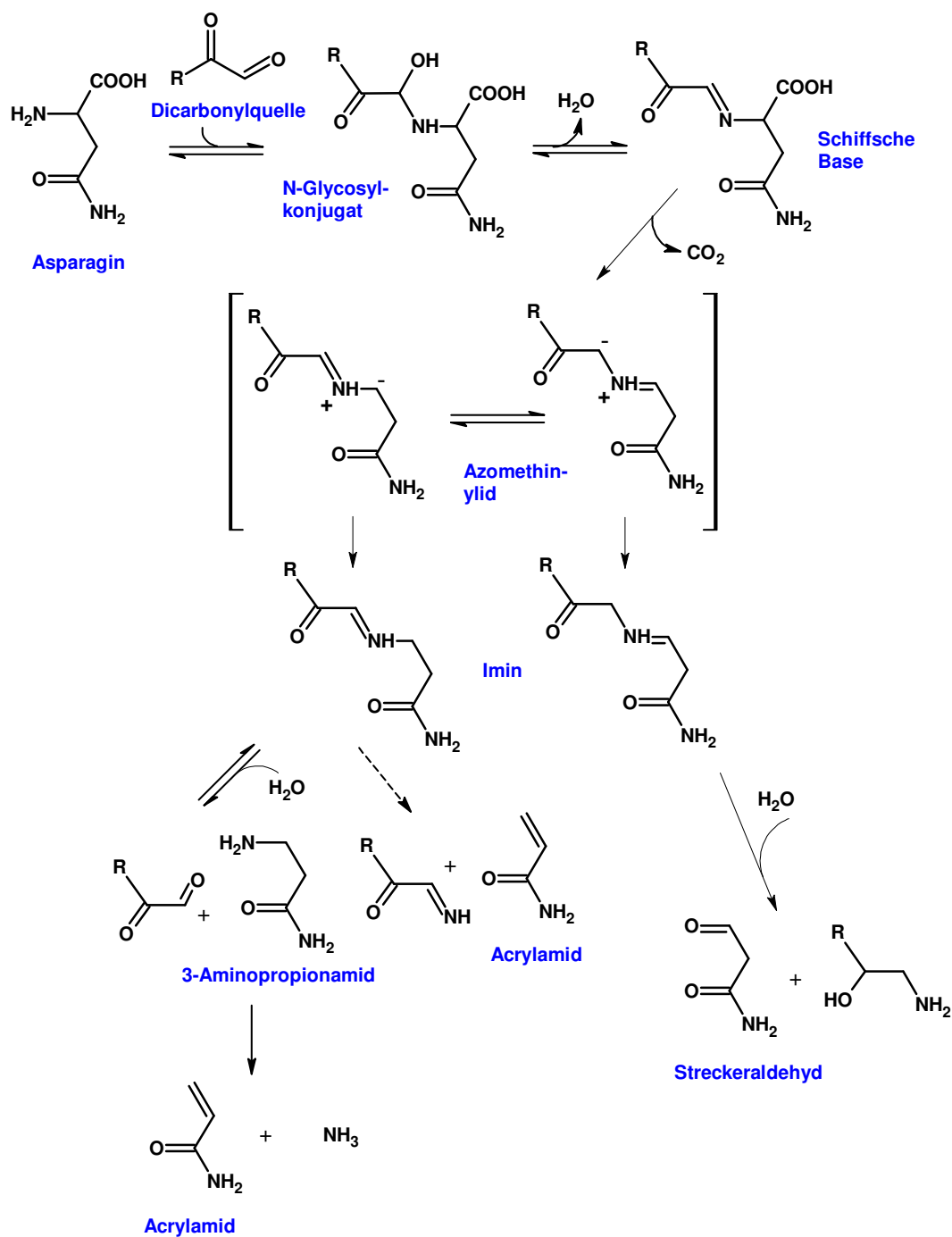


Abbildung 3: Mechanismus der Acrylamidbildung aus Asparagin und einer Dicarbonylquelle [Stadler *et al.*, 2004, Yaylayan *et al.*, 2003, Zyzak *et al.*, 2003]

Ein weiterer Mechanismus geht von Triacylglyceriden aus, die bei Temperaturen von ca. 200 °C Glycerin freisetzen, aus dem durch Dehydrierung Acrolein entsteht. Die oxidativ aus Acrolein entstehende Acrylsäure kann in Gegenwart eines Stickstoffdonors wie Ammonium oder Aminosäuren zu Acrylamid umgesetzt werden [Ehling *et al.*, 2005, Gertz, 2002, Grivas *et al.*, 2002]. Acrylsäure kann außerdem aus dem Gerüst verschiedener Aminosäuren oder durch Pyrolyse von Glucose über Methylglyoxal gebildet werden, so dass die Bildung von Acrylamid aus Peptiden oder

Kohlenhydraten möglich ist, jedoch nicht der bevorzugte Bildungsweg darstellt [Gertz, 2002].

Granvogl et al. zeigten erstmalig die Bildung von Glycidamid in Lebensmitteln auf. In Kartoffelchips wurden 1,5 µg/kg Glycidamid (0,5% der gefundenen Acrylamidmenge) und in Pommes frites 0,3-0,6 µg/kg Glycidamid (0,2% der gefundenen Acrylamidmenge) gefunden. Auf der Basis von Modellversuchen mit Kokosöl, das hauptsächlich gesättigte Fettsäuren enthält, und Sonnenblumenöl, das reich an ungesättigten Fettsäuren ist, wurde ein Einfluss der Hydroperoxide an der Bildung von Glycidamid in Lebensmitteln nachgewiesen. Der mögliche Bildungsweg des Glycidamids ist in Abbildung 4 (Prileschajew-Reaktion) dargestellt [Granvogl et al., 2008].

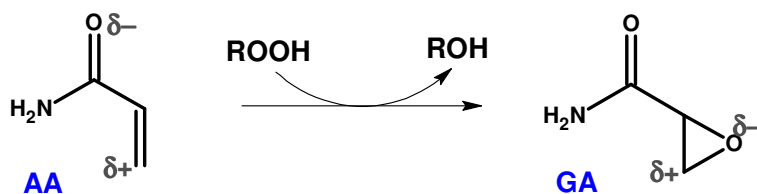


Abbildung 4: Möglicher Bildungsmechanismus von Glycidamid in Lebensmitteln [Granvogl et al., 2008]

3.1.5 Toxikokinetik

3.1.5.1 Aufnahme

Acrylamid kann in Folge einer dermalen, inhalativen oder oralen Exposition in den Organismus gelangen [Sumner et al., 2003]. In Studien an Fisher-344 Ratten wurde gezeigt, dass die Resorption von Acrylamid nach oraler Gabe vollständig ist. Bei einer Dosis von 10 mg [2,3-¹⁴C] Acrylamid/kg KG war kein Unterschied in der Ausscheidungsmenge zwischen oraler Gabe über Trinkwasser und intravenöser Gabe feststellbar. Das radiomarkierte Acrylamid verteilte sich schnell auf die verschiedenen Gewebe [Miller et al., 1982]. Ebenfalls in Fisher-344 Ratten zeigten Doerge et al., dass Acrylamiddosen von 0,1 mg/kg KG nach peroraler Gabe schnell und zu 60-98% aufgenommen wurden. Bei Aufnahme über die Nahrung betrug die Bioverfügbarkeit jedoch nur 32-44%, was auf einen ausgeprägten Einfluss durch die Lebensmittelmatrix schließen lässt [Doerge et al., 2005b]. In einer Resorptionsstudie in Schweinen, deren Verdauungstrakt große Ähnlichkeit mit dem des Menschen

aufweist, ließ sich kein derartiger Matrixeffekt beobachten. Vergleichende Untersuchungen zur Aufnahme von 0,8 sowie 8 µg Acrylamid/kg KG/d (entspricht der einfachen bzw. zehnfachen maximalen humanen Durchschnittsaufnahme) aus Trinkwasserlösungen oder aus kommerziellem Schweinefutter (Beimengung von Kartoffelchips mit definiertem Acrylamidgehalt) zeigte keine wesentlichen Unterschiede bei der Bildung des Biomarkers AAlVal (s. 3.3.4.2) in Bezug auf die Matrix [Aureli *et al.*, 2007]. Eine vergleichbare Beobachtung wurde bei Fütterungsversuchen an Ratten in der eigenen Arbeitsgruppe gemacht. Die Tiere erhielten Acrylamid über Trinkwasser (50 bzw. 100 µg/kg KG), geschnittene und rekonstituierte Pommes frites (100 µg/kg KG), Lebkuchen (100 µg/kg KG) sowie Brotkruste (50 µg/kg KG). Im Hinblick auf den deutlichen Anstieg des Biomarkers AAlVal (im Vergleich zur Kontrollgruppe) lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Matrices feststellen, während der Biomarker GAlVal im Bereich der Kontrolle verbleibt. Die Analyse der für die Erfassung kurzzeitiger Expositionen besser geeigneten Biomarker AAMA und GAMA, zeigt neben einer leicht erniedrigten Bioverfügbarkeit aus Brotkruste ebenfalls einen fehlenden Einfluss der Matrices auf [Berger, persönliche Mitteilung]. Sánchez *et al.* zeigten, dass die Resorption von Acrylamid auch von Fett- und Ballaststoffgehalt der Lebensmittelmatrix unabhängig ist [Sanchez *et al.*, 2008]. Der Einfluss verschiedener Aufnahmewege von Acrylamid auf den Metabolismus und die Bildung von Hämoglobinaddukten in Nagern wurde von Sumner *et al.* untersucht. Dabei wurden Speziesunterschiede nach inhalativer Exposition und Unterschiede in der Aufnahme zwischen dermalen und inhalativer Gabe beobachtet. Nach einer 6 h-Inhalation ($5,6 \text{ ppm} \cong 16,2 \text{ mg/m}^3 \cong 0,23 \text{ µmol/l}$) von $^{14}\text{C-AA}$ wurde nach 24 h in den männlichen Ratten 89 µmol AA-Äquivalente/kg KG gefunden, viermal weniger als in den männlichen Mäusen (401 µmol/kg KG). In den männlichen Ratten wurde nach dermalen Acrylamidexposition 14-30% der applizierten Dosis (162 mg $^{14}\text{C-AA/kg KG}$) absorbiert (Summe aus Urin, Fäzes, Ausatemluft, Gewebe). Nach einer inhalativen Applikation der Ratten mit 2,9 ppm (19 µmol) $^{14}\text{C-AA}$ war die Wiederfindung nach 24 h sechsmal geringer als nach dermalen Applikation [Sumner *et al.*, 2003].

Im Menschen zeigten Fennell *et al.*, dass die dermale Aufnahme nur 4,5% einer entsprechenden oralen Aufnahme (3,0 mg $^{13}\text{C}_3\text{-AA/kg KG}$) von Acrylamid beträgt. Die Aufnahme über die Haut findet zeitverzögert statt, da Acrylamid das Stratum corneum und die Dermis penetrieren muss und dann langsam in die systemische Zirkulation übertritt [Fennell *et al.*, 2005].

3.1.5.2 Verteilung

Es wurde im Tierexperiment gezeigt, dass sich Acrylamid unabhängig vom Expositionsweg schnell auf alle Gewebe verteilt. Nach oraler Aufnahme verteilte sich die Dosis von 10 mg ^{14}C -AA/kg KG in F344-Ratten vor allem auf Muskel (48%), Haut (15%), Blut (12%) und Leber (7%). Bereits nach einer Stunde (bis zum Ende der Studie nach sieben Tagen) wurden 12% der Radiomarkierung im Vollblut gefunden. Die Menge der Radioaktivität im Blutplasma betrug nach einer Stunde 3,4% und sank dann stetig ab [Miller *et al.*, 1982]. Sumner *et al.* beobachteten, dass nach 24-stündiger dermalen Applikation die Erythrozyten der Ratten das höchste relative ^{14}C -Level aufwiesen (ausgenommen der Haut an der Applikationsstelle). 24 h nach Beendigung einer 6-stündigen inhalativen Applikation wurde das höchste relative Level der Radiomarkierung ebenfalls im Blut detektiert ($\sim 0,1 \mu\text{mol/g}$). Sowohl bei dermalen als auch inhalativer Applikation verbleiben 24 h nach Beendigung der Applikation über 50% der aufgenommenen Dosis im Körper [Sumner *et al.*, 2003]. Der Verbleib des Acrylamids im Blut basiert auf der Fähigkeit von Acrylamid und seinem Metaboliten Glycidamid kovalent an Hämoglobin und Plasmaproteine zu binden [Calleman *et al.*, 1990].

Acrylamid überwindet auf Grund seiner hohen Wasserlöslichkeit sowohl die Plazenta- als auch die Blut-Hirn-Schranke. Soergel *et al.* fanden heraus, dass 10-50% des von der Mutter aufgenommenen Acrylamids auf den Fötus übergehen. Bei einer hohen Acrylamidaufnahme der Mutter, würde die Acrylamiddosis für ein 3 kg schweres Baby bis zu $3,3 \mu\text{g/kg KG}$ betragen. Acrylamid wurde auch in humaner Milch mit Gehalten von bis zu $18,8 \mu\text{g/l}$ gefunden [Sorgel *et al.*, 2002].

3.1.5.3 Metabolismus

Im Plasma von Ratten beträgt die biologische Halbwertszeit von Acrylamid nach i.p. (50 mg/kg KG) oder oraler (20 mg/kg KG) Gabe ~ 2 Stunden. Die maximale Plasmakonzentration von 30 (i.p.) bzw. 8 (oral) $\mu\text{g/ml}$ wurde nach 60 bzw. 104 Minuten erreicht [Barber *et al.*, 2001]. Der Metabolismus von Acrylamid umfasst verschiedene Reaktionswege der Giftung und Entgiftung (Abbildung 5).

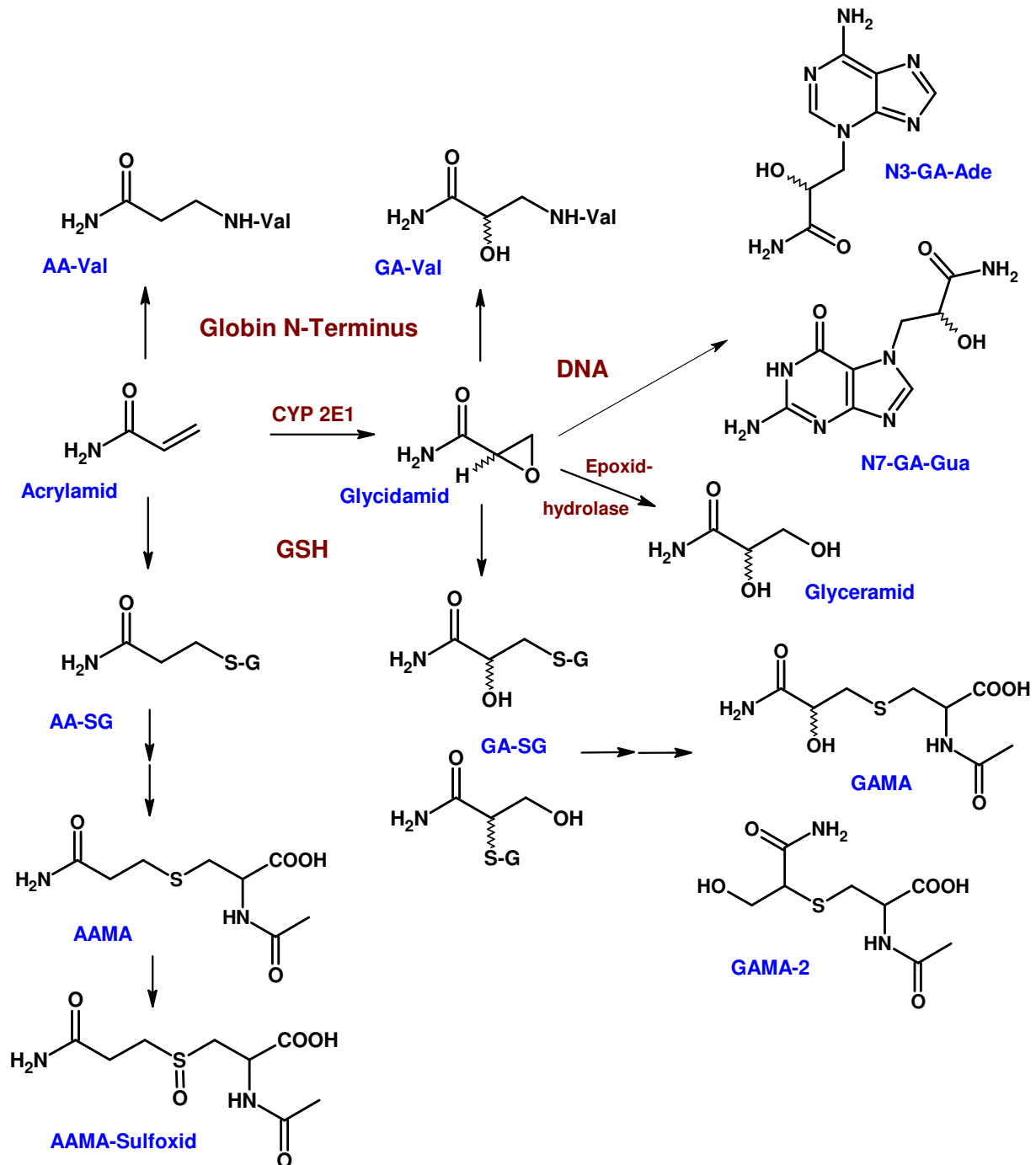


Abbildung 5: Metabolismus von Acrylamid [Calleman *et al.*, 1990, Sumner *et al.*, 1992]

Der oxidative Metabolismus zu Glycidamid, dem reaktiven Epoxidmetaboliten stellt eine Funktionalisierungsreaktion (Phase-1-Metabolismus) dar. Glycidamid wurde erstmals von Calleman *et al.* als S-(2-Carboxy-2-hydroxyethyl)cystein in hydrolysiertem Hämoglobin von mit Acrylamid behandelten Ratten gefunden [Calleman *et al.*, 1990]. Es wurde gezeigt, dass primär Cytochrom P450 2E1 für die Metabolisierung von Acrylamid zu Glycidamid verantwortlich ist. Wildtyp-Mäuse, Wildtyp-Mäuse mit Aminobenzotriazol-Vorbehandlung (Inhibition von CYP P450 Enzymen) und Mäuse ohne CYP 2E1-Aktivität (P450 2E1-Null) erhielten 50 mg/kg

¹³C-AA per oral. Im Urin der ABT-vorbehandelten Mäuse und der P450 2E1-Null Mäuse wurden keine Glycidamid-Metabolite gefunden [Sumner *et al.*, 1999]. In einer weiteren Studie wurde nach i.p. Gabe von 50 mg/kg ¹³C-AA in P450 2E1-Null Mäusen 6 Stunden nach Applikation 115 µM Acrylamid und 1,7 µM Glycidamid mittels LC/MS/MS im Plasma quantifiziert. Die gefundenen Spuren von GA deuten auf einen weiteren, allerdings wenig relevanten Bildungsweg hin. Die Level von Acrylamid-Hämoglobin-Addukten waren im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen um den Faktor 2 höher [Ghanayem *et al.*, 2005].

Cytochrom P450 2E1 ist hauptsächlich für den oxidativen Metabolismus von Ethanol und einer Vielzahl niedermolekularer Xenobiotika, darunter 1,3-Butadien, Benzol, Acetaldehyd und den Nitrosaminen, verantwortlich. Es wird vermutet, dass CYP 2E1 eine Rolle bei Xenobiotika-induzierten Krankheiten spielt, da der oxidative Metabolismus eine kanzerogene Aktivität vieler dieser Substanzen impliziert. Genetische Polymorphismen von CYP 2E1 werden als Risikofaktoren für die Entwicklung von Krebs im Menschen vermutet [Wu *et al.*, 1997].

Studien von Calleman *et al.* deuteten darauf hin, dass die Oxidation von Acrylamid zu Glycidamid, bestimmt in Form der Hämoglobinaddukte, in Ratten sättigbar ist und der in Glycidamid umgewandelte Anteil bei abnehmenden Dosen im Bereich von 0,5-100 mg/kg KG deutlich zunimmt (bis zu 60%) [Calleman *et al.*, 1993]. In Humanstudien wurde dieser Effekt im Dosisbereich von 0,5-3 mg/kg KG aus dem Verhältnis der Mercaptursäuren von Acrylamid und Glycidamid jedoch nicht beobachtet [Fennell *et al.*, 2006]. Es wurde gezeigt, dass die Umwandlung von Acrylamid in Glycidamid im Menschen im Vergleich zur Ratte (41 % bei 3 mg/kg KG) und Maus (59 % bei 50 mg/kg) deutlich geringer zu sein scheint [Fennell *et al.*, 2005, Sumner *et al.*, 1992]. Fennell *et al.* bestimmten in Nichtrauchern ein Verhältnis von N-Acetyl-S-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)cystein (GAMA) zu N-Acetyl-S-(2-carbamoyl-ethyl)cystein (AAMA) von 0,024-0,026 [Fennell *et al.*, 2006]. GAMA-2 wurde in humanem Urin in Anteilen von 0,8 % der oral aufgenommenen Acrylamidmenge von 1 mg gefunden [Hartmann *et al.*, 2008a]. Boettcher *et al.* publizierten ein GAMA/AAMA-Verhältnis von 0,03-0,53 mit einem Median von 0,16 und betrachteten die metabolische Umwandlung beim Menschen auf dieser Basis als vergleichbar mit der Ratte [Boettcher *et al.*, 2005]. Unter Verwendung derselben Methodik fanden Fuhr *et al.* eine GAMA/AAMA-Verhältnis von 0,118 [Fuhr *et al.*, 2006]. In einer Humanverzehrstudie mit Acrylamid wurde eine GAMA/AAMA-Verhältnis von 0,024 gefunden. Die Autoren schlussfolgerten aus den Ergebnissen der Studie, dass CYP 2E1 ein wichtiges aber möglicherweise nicht das einzige Enzym ist, das im

Menschen an der oxidativen Umsetzung von Acrylamid zu Glycidamid beteiligt ist. Desweiteren wurden keine offensichtlichen genetischen Risikofaktoren im Hinblick auf die individuellen CYP 2E1- sowie GST-Genotypen gefunden [Doroshenko *et al.*, 2008]. Fennell *et al.* verglichen den Metabolismus von Menschen und Nagern miteinander. Das Ausmaß der Oxidation von Acrylamid zu Glycidamid wird in der Reihenfolge Maus > Ratte > Mensch eingestuft und ist bei den Nagern im Vergleich zum Menschen 2-4-fach stärker ausgeprägt [Fennell und Friedman, 2005]. Speziesunterschiede zeigen sich beim Metabolismus von Glycidamid. In Ratte und Maus wird die Hauptmenge des Glycidamids mit Glutathion konjugiert, während beim Menschen der überwiegende Teil des Glycidamids über Hydrolyse zum Glyceramid entgiftet zu werden scheint. Bei einer oral aufgenommenen Menge von 3 mg $^{13}\text{C}_3$ -Acrylamid/kg KG betrug der Anteil von Glyceramid 11% der Metabolite im menschlichen Urin, von Glycidamid 2,6%, während der Anteil von GAMA unterhalb der Bestimmungsgrenze lag [Fennell und Friedman, 2005, Sumner *et al.*, 1997].

Eine weitere Möglichkeit die Umwandlungsrate von Acrylamid zu Glycidamid abzuschätzen ist über eine Betrachtung der Hämoglobinaddukte gegeben. Eine Vielzahl von Studien gibt Aufschluss über das Verhältnis der Addukte von Acrylamid und Glycidamid mit dem N-terminalen Valin des Hämoglobins. Das Verhältnis von GA-Val zu AA-Val reicht von 0,07 [Perez *et al.*, 1999] bis 0,96 [Paulsson *et al.*, 2003a] und variiert damit über einen weiten Bereich.

Bei den GAMA/AAMA- sowie den GA-Val/AA-Val-Verhältnissen ist jedoch nicht die unterschiedliche Reaktionskinetik von Acrylamid und Glycidamid mit der Thiolgruppe des Glutathions bzw. der N-terminalen Aminogruppe des Hämoglobins berücksichtigt, so dass diese Verhältnisse nicht direkt das Dosisverhältnis von Acrylamid und Glycidamid widerspiegeln.

Eine weitere wichtige Metabolisierungsreaktion von Acrylamid ist die Konjugation (Phase-2-Metabolismus) mit der Thiolgruppe des Glutathions (GSH, L- γ -Glutamyl-L-cysteinylglycin) [Miller *et al.*, 1982, Sumner *et al.*, 1992]. Die direkte Konjugation von Acrylamid mit GSH scheint beim Menschen eine bedeutendere Rolle zu spielen als die oxidative Aktivierung zu Glycidamid [Fuhr *et al.*, 2006]. Die Biosynthese des GSH erfolgt ADP-abhängig in der Leber durch enzymatische Verknüpfung von L-Glutaminsäure mit L-Cystein und anschließender Kondensation mit Glycin katalysiert durch Glutathion-Synthetase [Commandeur *et al.*, 1995]. Durch die Reaktion von GSH werden viele Xenobiotika mit elektrophilem Charakter, z. B. in der Leber, entgiftet. Dieser Schritt kann durch die Glutathion-S-Transferase (GST) beschleunigt werden. Kleinere Konjugate werden in das Blut, größere Konjugate bevorzugt in die

Galle abgegeben. Während die Konjugate über die Galle auch unverändert ausgeschieden werden können, sind sie überwiegend einem mehrstufigen Abbaumechanismus unterworfen [Eisenbrand und Metzler, 2002]. Beim ersten Schritt wird die Glutaminsäure, katalysiert von der γ -Glutamyltranspeptidase, dann Glycin, katalysiert von der Cysteinylglycine dipeptidase bzw. der Aminopeptidase M, abgespalten. Das verbleibende Cysteinderivat wird mittels Cystein-S-Konjugat-N-Acetyltransferase zur Mercaptursäure acetyliert [Commandeur *et al.*, 1995]. Die Mercaptursäure von Acrylamid (AAMA) kann im Menschen in das entsprechende Sulfoxid (N-Acetyl-S-(2-carbamoyl-ethyl)cystein-S-oxid) weitermetabolisiert werden [Fennell *et al.*, 2006, Fennell *et al.*, 2005].

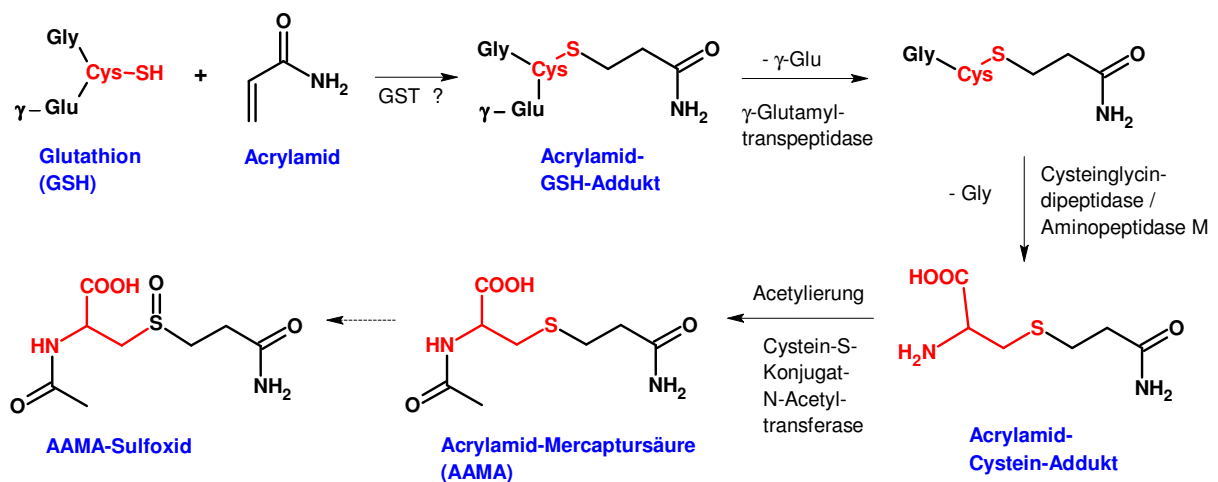


Abbildung 6: Abbau der GSH-Addukte zu Mercaptursäuren am Beispiel von Acrylamid [Commandeur *et al.*, 1995]

Die Bildung von DNA-Addukten durch Glycidamid spielt keine quantitative Rolle und wird an anderer Stelle dargestellt (Kapitel 3.3.5). Xie *et al.* zeigten, dass Teepolyphenole, Reveratrol und Diallyltrisulfid durch Modulation der CYP 2E1- und GST-Aktivität effektive Inhibitoren der Acrylamidadduktbildung mit Leber-DNA, Protamin und Hämoglobin darstellen [Xie *et al.*, 2008].

3.1.5.4 Ausscheidung

Acrylamid und seine Metaboliten werden überwiegend über die Niere ausgeschieden [Miller *et al.*, 1982, Sumner *et al.*, 1992]. Die Ausscheidung von Acrylamid und seinen Metaboliten in der Ratte verläuft biphasisch. Während die erste Eliminierungsphase eine Halbwertszeit von < 5 h aufweist, beträgt die Halbwertszeit der zweiten Phase < 8 d. Nach 24 h sind 62% der Dosis, nach 7 d 71% über den Urin ausgeschieden. In den Fäzes werden nach 7 d nur 6 % der Dosis detektiert. Ein Anteil von 15% der Gesamtradioaktivität wurde über die Galle ausgeschieden [Miller *et al.*, 1982]. In

Untersuchungen im eigenen Arbeitskreis wurde gezeigt, dass in der Ratte 40-65 % der oral aufgenommenen Acrylamidmenge in Form von AAMA und GAMA über den Urin ausgeschieden werden [Berger, persönliche Mitteilung]. Auch beim Menschen erfolgt die Ausscheidung hauptsächlich über den Urin [Fennell *et al.*, 2006, Fuhr *et al.*, 2006]. Fennell *et al.* fanden für Acrylamid eine Halbwertszeit von 3,1-3,5 Stunden (nach oraler Aufnahme von 0,5-3,0 mg über Trinkwasser) und Fuhr *et al.* von $2,4 \pm 0,4$ Stunden (nach oraler Aufnahme von 0,94 mg in Form von Kartoffelchips) im humanen Urin. Die Wiederfindungsrate im Urin bei einer oral in Form von Kartoffelchips aufgenommenen Dosis von 0,94 mg AA/kg KG betrug 60,3 % nach 72 h [Fuhr *et al.*, 2006], bei einer oral aufgenommenen Dosis von 3 mg ^{13}C -AA/kg KG 46% nach 24 h [Fennell *et al.*, 2006].

Die folgende Tabelle (Tabelle 3) gibt eine Auswahl über Studien, in denen die im Urin verschiedener Spezies gefundenen Metabolite von Acrylamid quantifiziert wurden.

Tabelle 3: Metabolitenverteilung von Acrylamid im Urin verschiedener Spezies [Wiederfindung in % der gegebenen Dosis]

Studie	Acrylamid	AAMA	AAMA-S-oxid	Glycidamid	Glyceramid	GAMA	GAMA2
Sumner <i>et al.</i> (1992); Ratte	NQ	71 ± 4	NG	7 ± 2	$1,2 \pm 0,5$	13 ± 2	$6,8 \pm 1$
Doerge <i>et al.</i> (2007); Ratte	3	46	ND	9	NG	42	
Sumner <i>et al.</i> (1992); Maus	NQ	41 ± 2	NG	17 ± 2	5 ± 1	21 ± 3	12 ± 1
Doerge <i>et al.</i> (2007); Maus	1,6	18	ND	40	NG	40	
Fuhr <i>et al.</i> (2006); Mensch	7	83	NG	ND	NG	10	n.d.
Fennell <i>et al.</i> (2005); Mensch	ND	72	14	2,6	11	NQ	ND
Fennell <i>et al.</i> (2006); Mensch	10	68	18	1	NG	< 2	
Doroshenko <i>et al.</i> (2008); Mensch	2,9	65	NG	NG	NG	1,7	NG
Hartmann <i>et al.</i> (2008); Mensch	NG	51,7	NG	NG	NG	4,6	0,8

NQ: nicht quantifiziert, ND: nicht detektiert, NG: nicht gemessen

Es zeigt sich, dass bei der Ratte und beim Menschen die Konjugation von Acrylamid mit GSH den oxidativen Metabolismus zu Glycidamid deutlich überwiegt. Insbesondere beim Menschen werden hohe Anteile von AAMA (N-Acetyl-S-(2-carbamoylethyl)cystein) gefunden [Fennell und Friedman, 2005, Fennell *et al.*, 2006, Fuhr *et al.*, 2006]. Bei Biomonitoring-Studien beträgt die Konzentration von AAMA im Urin von Nichtrauchern ($n = 16$) im Median 29 $\mu\text{g/L}$, im Urin von Rauchern ($n = 13$) im Median 127 $\mu\text{g/L}$. Die GAMA-Gehalte bei den Nichtrauchern wurden im Median mit 5 $\mu\text{g/L}$ Urin bestimmt [Boettcher und Angerer, 2005]. In einer anderen Studie wurden bei Nichtrauchern ($n = 13$) im Median AAMA-Gehalte von 26 $\mu\text{g/L}$ Urin und GAMA-Gehalte von 3 $\mu\text{g/L}$ Urin gefunden [Kellert *et al.*, 2006]. Fennell *et al.* wiesen mit dem AAMA-Sulfoxid einen bisher nicht bekannten Metaboliten nach, der im Menschen in relevanten Mengen gebildet wird, jedoch nicht in Nagern, und quantifizierten diesen [Fennell und Friedman, 2005, Fennell *et al.*, 2006].

3.1.6 Toxikodynamik

3.1.6.1 Neurotoxizität

Neurotoxische Wirkungen von Acrylamid werden bereits seit den 1950er Jahren untersucht [Calleman *et al.*, 1994]. Die arbeitsplatzbedingte Exposition von Menschen und die experimentelle Intoxikation von Versuchstieren mit Acrylamid verursacht ein neurotoxisches Syndrom, das als zentral-periphere distale Axonopathie bezeichnet und durch Ataxien, Skelettmuskelschwäche, Taubheit der Extremitäten und Gewichtsverlust charakterisiert ist [Calleman *et al.*, 1994, Lehning *et al.*, 2002]. In einer Arbeitsplatzstudie, an der 41 stark mit Acrylamid exponierte chinesische Arbeiter teilnahmen, wurde gezeigt, dass insbesondere die Hämoglobinaddukte mit Acrylamid besser mit der klinischen Diagnose einer peripheren Neuropathie korrelieren als externe Expositionsmessungen am Arbeitsplatz. Das durchschnittliche Level der Hämoglobinaddukte betrug 13,4 nmol/g Hb in der Gruppe der Synthesearbeiter [Calleman *et al.*, 1994].

In Langzeitstudien an Ratten wurde nach chronischer oraler Dosis von 2,0 mg/kg KG/Tag eine Degeneration der peripheren Nerven beobachtet. Detektiert wurden diese Veränderungen mikroskopisch; klinische Symptome der peripheren Neuropathie traten nicht auf [Friedman *et al.*, 1995, Johnson *et al.*, 1986]. Der NOAEL

für die neurotoxischen Wirkungen von Acrylamid wurde von der WHO 2002 auf der Basis bisheriger Tierversuche mit 0,5 mg/kg KG/Tag angegeben [WHO, 2002].

Es werden verschiedene Mechanismen der Neurotoxizität diskutiert. Es wird vermutet, dass Acrylamid Membranfusionsprozesse unterbricht, welche die Neurotransmission vermitteln [LoPachin, 2004]. So führt beispielsweise eine Beeinträchtigung der axonalen Na^+/K^+ -ATPase zu einer Störung des Membranpotentials und in der Folge zu einer Degeneration der Axone [Barber *et al.*, 2001]. Ein weiterer molekularer Mechanismus beruht auf der Bildung von Addukten mit nukleophilen Zentren in neuronalen Schlüsselproteinen [LoPachin und DeCaprio, 2005]. Die Bindung an Motorproteine wird als Ursache der distalen Axonopathie diskutiert [Tyl und Friedman, 2003]. Die Bedeutung von Glycidamid bei der Induktion von Neurotoxizität scheint im Vergleich zu Acrylamid eine untergeordnete Rolle zuzukommen [LoPachin, 2004, Tyl und Friedman, 2003].

3.1.6.2 Reproduktionstoxizität

Die reproduktionstoxischen Effekte von Acrylamid auf Ratten und Mäuse wurden in Multigenerationsstudien untersucht. So erhielten männliche und weibliche F344 Ratten Acrylamiddosen von 0-5,0 mg/kg KG/Tag mit dem Trinkwasser. Die beobachteten Effekte waren eine signifikante Verringerung der Fruchtbarkeit der männlichen Tiere, der Anzahl der Nachkommen und des Geburtsgewichts sowie eine Reduzierung des Spermientransports im Uterus. Die weibliche Reproduktionsfähigkeit wird durch Acrylamid weit weniger stark beeinträchtigt. Als mögliche Mechanismen kommen die Bindung von Acrylamid und Glycidamid an Spermatidprotamine mit der Folge einer Beeinträchtigung von Lebensdauer und Morphologie der Spermien, sowie die Bindung von Acrylamid an Motorproteine, welche die Mobilität der Spermien herabsetzt, in Frage [Tyl und Friedman, 2003]. In den Spermien von männlichen Mäusen wurde die Bildung von Acrylamid-Protamin-Addukten mittels Accelerator Mass Spectrometry (AMS) bestimmt. Bei hohen Dosen ($> 7,5 \mu\text{g/kg KG}$) überstieg die Adduktbildung mit Protamin deutlich die Bildungsraten mit Hämoglobin, Serumalbumin und DNA [Xie *et al.*, 2006]. Der NOAEL von Acrylamid wurde für reduzierte Fertilität auf 5 mg/kg KG/Tag und für den frühgeburtlich bedingten Tod des Embryos auf 2 mg/kg KG/Tag festgelegt [WHO, 2002].

3.1.6.3 Genotoxizität

In vitro

Acrylamid induziert keine Genmutationen in *Salmonella typhimurium* im Ames-Test. Im Gegensatz dazu zeigt Glycidamid hier eine mutagene Aktivität mit und ohne metabolische Aktivierung. Acrylamid zeigt uneindeutige, negative oder schwach positive Ergebnisse in Säugerzellen Genmutationsassays. In den Maus-Lymphomazellen waren durch Acrylamid ausgelöste Mutationen am *tk*-Lokus (Thyminidin-Kinase-Gen) und am *hprt*-Lokus (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-Gen) feststellbar, jedoch keine Veränderungen in V79-Zellen (Lungenfibroblasten des Chinesischen Hamsters) [Dearfield *et al.*, 1995]. Acrylamid induziert Chromosomenaberrationen, Mikronuklei, Schwesterchromatidaustausch, Polyploidie und Aneuploidie auch in Abwesenheit metabolischer Aktivierung und stellt somit ein direkt wirkendes Klastogen dar [Carere, 2006]. Acrylamid zeigt im *hprt*-Mutagenitätstest bis zu 10 mM keine signifikanten Effekte, Glycidamid hingegen induziert ab 800 µM Mutationen. In Untersuchungen mit der Einzelzellgelelektrophorese (Comet Assay) erzeugte Acrylamid nach vierstündiger Inkubationszeit mit Konzentrationen von bis zu 6 mM keine Effekte, während Glycidamid ab Konzentrationen von 300 µM DNA-Schäden hervorrief [Baum *et al.*, 2005]. Eine weitere Sensitivisierung des Comet Assays lässt sich durch eine zusätzliche Behandlung der Zellen mit dem DNA-Base-Excision Repairenzym FPG erzielen. FPG erkennt verschiedene Arten von DNA-Schäden, wie oxidierte Purinbasen und daraus resultierende ring-geöffnete Formamido-pyrimidine/Imidazole (FaPy), allerdings auch alkylierte FaPy, welche aus einem entsprechenden DNA Addukt gebildet wurden, und entfernt diese aus der DNA als zusätzliche Strangbrüche. Unter Anwendung dieser Methodik induzierte Glycidamid nach ebenfalls vierstündiger Inkubation bereits DNA-Strangbrüche ab 10 µM [Thielen *et al.*, 2006].

In vivo

Untersuchungen an *Drosophila melanogaster* hinsichtlich Genmutationen brachten uneindeutige Ergebnisse [Carere, 2006, Dearfield *et al.*, 1995]. In verschiedenen Studien mit Mäusen zeigte Acrylamid eine Induktion struktureller Chromosomenaberrationen, Mikronuklei oder Polyploidie [IARC, 1994, WHO, 2002]. Es wurde nachgewiesen, dass Glycidamid Mikrokerne in Knochenmarkszellen von

Ratte und Maus nach i.p. Injektion induziert. Dabei wurde bei der Behandlung mit synthetischem Glycidamid eine ähnliche Mikrokernfrequenz pro Einheit der *in vivo* Dosis gefunden wie bei einer vorausgegangenen Studie, bei der die Mäuse mit Acrylamid behandelt wurden und Glycidamid nur als Metabolit auftrat [Paulsson *et al.*, 2002, Paulsson *et al.*, 2003b]. Dieser Befund weist darauf hin, dass Glycidamid wesentlich zum genotoxischen Potential von Acrylamid beiträgt [Carere, 2006]. Bei der Untersuchung mit dem „unscheduled DNA assay“ (UDS) in der Leber von Ratten zeigte Acrylamid negative Befunde. Glycidamid hingegen induzierte UDS in Mausspermatiden [Carere, 2006, Dearfield *et al.*, 1995, Generoso *et al.*, 1996]. Insgesamt deuten die Befunde aus *in vivo* Assays mit Säugerzellen darauf hin, dass Acrylamid klastogene Eigenschaften besitzt und mit dem Spindelapparat interferiert [Carere, 2006].

Das komplexe Muster der Ergebnisse der Genotoxizitätsstudien von Acrylamid resultiert aus dem Zusammenwirken der biologischen Aktivitäten von Acrylamid selbst (Michael-artige Reaktion) und seinem Metaboliten Glycidamid (direkte nukleophile Substitution). Aufgrund der hohen Affinität zur Bildung von Addukten mit Proteinen wie den chromosomalassozierten Proteinen (Protamine) verursacht Acrylamid vorzugsweise genotoxische Effekte auf der chromosomalen Ebene (chromosomale Aberrationen, Aneuploidie). Acrylamid zeigt Effekte auf den synaptoneuralen Komplex und den Spindelapparat. Glycidamid zeigt eine hohe Kapazität zur Bindung an die DNA, wirkt dadurch mutagen und scheint im wesentlichen für die Entstehung von Mikronuklei durch einen chromosomenbrechenden Mechanismus verantwortlich zu sein [Carere, 2006].

3.1.6.4 Kanzerogenität

Tierexperimentelle Studien

Zur Untersuchung der kanzerogenen Wirkung von Acrylamid an Ratten wurden zwei Langzeitstudien durchgeführt [Friedman *et al.*, 1995, Johnson *et al.*, 1986]. Die Ratten erhielten Acrylamid zwei Jahre lang über Trinkwasser in Dosen von bis zu 3 mg/kg KG/Tag. In der ersten Studie zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Inzidenzen von Schilddrüsentumoren und peritonealen Mesotheliomen in der Region der Hoden bei den männlichen Tieren sowie Tumore der Brustdrüse, des zentralen Nervensystems, der Schilddrüse, der Mundhöhle und der Gebärmutter bei den weiblichen Tieren [Johnson *et al.*, 1986]. In der zweiten, darauf aufbauenden Studie wurden geschlechtsunspezifisch Schilddrüsentumore, peritestikuläre Mesotheliomen in den männlichen Tieren und Brusttumore in den weiblichen Tieren gefunden werden

[Friedman *et al.*, 1995]. Die niedrigste kanzerogene Dosis, die in diesen Studien gefunden wurde, betrug 1-2 mg/kg KG/Tag.

Epidemiologische Studien

In einer Kohortenstudie mit 371 untersuchten Arbeitern in der Monomer- und Polymerproduktion im Zeitraum von 1955-79 wurde keine signifikante Erhöhung der Tumorinzidenz festgestellt [Sobel *et al.*, 1986]. Die statistische Aussagekraft dieser Studie ist durch die geringe Größe der Kohorte sowie durch mögliche Einflüsse durch Acrylnitril gering [Carere, 2006]. Ein deutlich umfangreichere Kohortenstudie mit 8854 Arbeiter, die den Zeitraum von 1925-76 erfasst, zeigte ebenfalls keine signifikante dosisbezogene Erhöhung der Tumorinzidenz. Als Referenz dienten die lokalen Sterberaten sowie nationale und lokale Krebsraten [Collins *et al.*, 1989]. Bei dem Follow-up dieser Kohorte (beschränkt auf 8508 Arbeiter) für den Zeitraum 1984-94 wurde in der Gruppe der Arbeiter mit der höchsten kumulativen Exposition ($> 0,3 \text{ mg/m}^3 \text{ /Jahr}$) eine signifikante 2,26-fache Erhöhung der Pankreaskrebsinzidenz beobachtet [Marsh *et al.*, 1999]. Kritisch hinterfragt wurde die Nichterfassung von Störfaktoren wie dem Tabakkonsum [Carere, 2006].

Um das möglicherweise von frittierten / gebackenen Kartoffeln ausgehende Krebsrisiko zu klären, werteten Pelucchi *et al.* sechs vorhandene Fall-Kontrollstudien aus. Ausgehend von Verzehrprotokollen wurden Unterschiede der Acrylamidaufnahme zwischen der Fall- und der Kontrollgruppe für jede der sechs untersuchten Tumorarten berechnet. Die Ergebnisse waren negativ [Pelucchi *et al.*, 2003]. In einer weiteren Studie von Mucci *et al.* wurden eine populationsbasierte Fall-Kontrollstudie aus Schweden reanalysiert, um den möglichen Zusammenhang einer Acrylamidaufnahme über die Nahrung und Tumorraten in Dickdarm, Blase und Niere zu untersuchen. Die Acrylamidaufnahme wurde aus allgemeinen Verzehrdaten und Durchschnittsgehalten von Acrylamid in Lebensmitteln abgeleitet. Limitierungen wie die Bestimmung einer geeigneten Kontrollgruppe und die stark begrenzte Anzahl der einbezogenen Krebsarten trugen dazu bei, dass keine statistisch gesicherten Erkenntnisse gewonnen werden konnten [Carere, 2006, Mucci *et al.*, 2002].

Es werden verschiedene Mechanismen der Kanzerogenität von Acrylamid diskutiert. Ein genotoxischer Mechanismus ausgehend von Glycidamid, das DNA-Addukte *in vivo* bildet, ist sehr wahrscheinlich [Rice, 2005, Segerback *et al.*, 1995]. Die in den Tierversuchen beobachteten Tumortypen traten vorwiegend in endokrin-sensitiven Organen auf, so dass auch ein epigenetischer Mechanismus in Frage kommt. Auf Grund seiner Reaktivität gegenüber Proteinen wie Enzymen oder Rezeptoren könnte Acrylamid Veränderungen in zellulären Funktionen und Signalwegen verursachen.

Auch eine anhaltende hormonelle Störung kann mit der Förderung von Mutationen und der Kanzerogenese assoziiert sein [Carere, 2006, Klaunig, 2008, Park *et al.*, 2002].

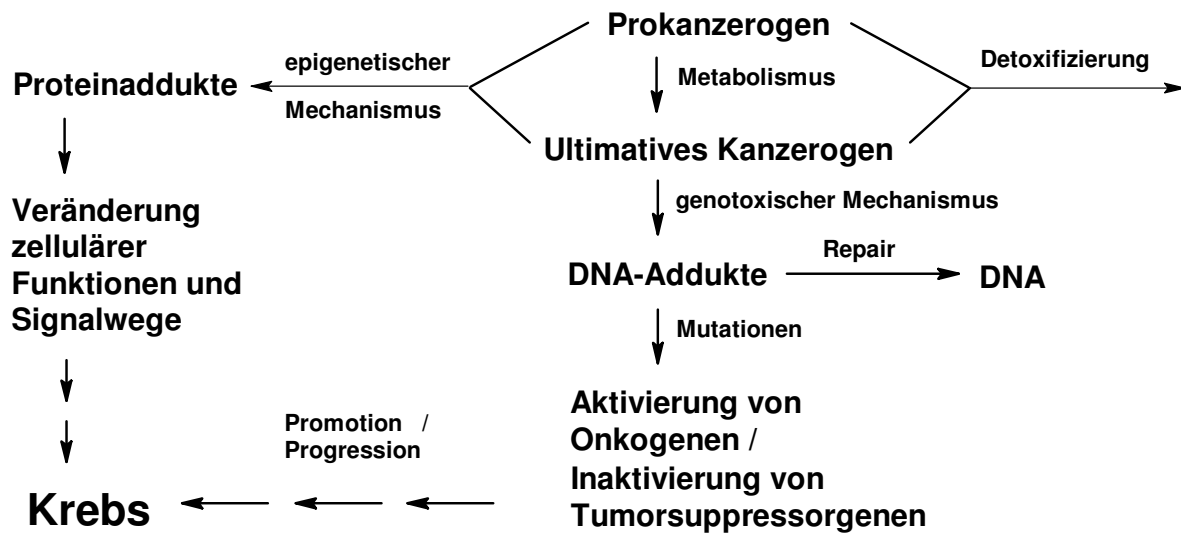


Abbildung 7: Mechanismus der chemischen Kanzerogenese [Watson und Mutti, 2004]

3.1.7 Risikobewertung von Acrylamid

Für die neurotoxischen und reproduktionstoxischen Eigenschaften von Acrylamid wurden NOAELs festgelegt. Die über die Nahrung aufgenommenen Mengen von Acrylamid liegen weit unterhalb dieses Bereichs (ca. 50-300 fach), so dass eine Gefährdung der Allgemeinbevölkerung bezüglich dieser Eigenschaften ausgeschlossen werden kann [Madle *et al.*, 2003, WHO, 2002]. Für genotoxische Kanzerogene wurden bisher Dosis-Wirkungsbeziehungen ohne Schwellenwert als sog. „worst case“ angenommen („linear-at-low-dose, no threshold“-Modell). Die Charakterisierung der Gefährdung durch Acrylamid kann durch Berechnung des Parameters T25, d.h. die Dosis, welche die Tumorinzidenz unter Standardbedingungen um 25% erhöht [Dybing *et al.*, 2002] bzw. des in den USA verwendeten Parameters LED10 (unteres 95%-Konfidenzintervall für die Dosis, bei der weniger als 10 % der Organismen einen Effekt zeigen) erfolgen. Zur Abschätzung des von Acrylamid ausgehenden Risikos während der gesamten Lebensdauer an Krebs zu erkranken, werden die durchschnittlichen täglichen Aufnahmemengen mit den Gefährdungsdaten korreliert. Bei einer lebenslangen Exposition mit 1 µg Acrylamid/kg KG/Tag über Lebensmittel und einer Lebensdauer von 70 Jahren beträgt das Lebenszeitrisiko einer Krebserkrankung (lifetime cancer

risk) durch Acrylamid durchschnittlich $0,6 \times 10^{-3}$, d.h. Acrylamid ist als Ursache von 6 Krebserkrankungen pro 10.000 Einwohner anzunehmen. Für die 2,5% männlichen Erwachsenen mit der höchsten Acrylamidaufnahme ($1,62 \mu\text{g/kg KG/Tag}$) werden sogar 21 Krebserkrankungen pro 10.000 Einwohner erwartet. Im Vergleich ist für Frauen das Lebenszeitrisko einer Krebserkrankung durch Acrylamid wenig geringer [Dybing und Sanner, 2003]. Auf der Basis der beiden Kanzerogenitätsstudien in der Ratte [Friedman *et al.*, 1995, Johnson *et al.*, 1986] sowie neu generierten Daten aus *in vivo* Kurzzeitversuchen mit Bestimmung der *in vivo* Dosis von Acrylamid und Glycidamid nach Gabe von Acrylamid in Trinkwasser (in dem gleichen Konzentrationsbereich wie in den Langzeitstudien) führten Törnqvist et al. eine Bewertung mit dem Relative Cancer Risk Model durch. Für eine endgültige Risikoabschätzung mit Hilfe dieses Modells ist die Datenlage jedoch noch nicht ausreichend [Törnqvist *et al.*, 2008].

Das Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) der WHO verwendete 2005 die Benchmark Dose (BMD)/ Margin of Exposure (MOE) Methodik und berechneten damit die BMD sowie den Benchmark Dose Lower Confidence Limit (BMDL). Die Verwendung des BMDL hat den Vorteil, dass keine Extrapolation über die beobachtete Toxizität hinaus nötig ist und ein Maß für die Datenunsicherheit enthält. Der MOE ist der Quotient aus dem sensitivsten Wert aus den tierexperimentellen Kanzerogenitätsstudien und der geschätzten Exposition der Allgemeinbevölkerung über Lebensmittel. Wenn die durchschnittliche Acrylamidaufnahme der Bevölkerung von $0,001 \text{ mg/kg KG/Tag}$ zu dem BMDL von $0,30 \text{ mg/kg KG/Tag}$ für die Induktion von Gebärmuttertumoren in der Ratte in Beziehung gesetzt wird, resultiert ein MOE von 300. Für Konsumenten mit hoher Acrylamidaufnahme ($0,004 \text{ mg/kg KG/Tag}$) ergibt sich ein MOE von 75. JECFA schlussfolgerte daraus, dass die gefundenen MOEs niedrig sind für eine genotoxische und kanzerogene Substanz und dass damit ein gesundheitliches Risiko für den Menschen gegeben sein könnte [Doerge *et al.*, 2008, WHO, 2005].

Doerge et al. verwendeten ein Pharmakokinetik/ Pharmakodynamik (PBPK/PD) Modell zur Abschätzung des Lebenszeitkrebsrisikos. Dazu wurde ein linearer Zusammenhang zwischen N7-GA-Gua Adduktgehalten und Krebsinzidenzen angenommen. Das Lebenszeitkrebsrisiko von $1 - 4 \times 10^{-4}$ wurde aus dem Verhältnis Humaninzidenz/Human-DNA-Adduktgehalt = Inzidenz in der Ratte/DNA-Adduktgehalt in der Ratte erhalten [Doerge *et al.*, 2008].

Bei der Risikobewertung von Acrylamid müssen einige Unsicherheiten beachtet werden. So ist bei den untersuchten Lebensmitteln einer Art eine große Varianz der Analyseergebnisse festzustellen, mit der Folge, dass die auf den ermittelten Durchschnittsgehalten basierende Berechnung der Exposition durch Lebensmittel nicht unbedingt mit der tatsächlichen Aufnahme übereinstimmt. Desweiteren wird von einer Bioverfügbarkeit von 100% ausgegangen. Der Einfluss von Matrixeffekten, der die tatsächliche Aufnahme des im Lebensmittel vorhandenen Acrylamids verringern könnte, ist Gegenstand derzeitiger Untersuchungen. Bei allen bisher vorgenommenen Risikobewertungen von Acrylamid verwendet eine lineare Extrapolation, um das Risiko im Niedrigdosisbereich zu beschreiben. Eine solche Extrapolation ist vor dem Hintergrund zellulärer Schutzmechanismen, die in diesem Dosisbereich von Bedeutung sind, jedoch fraglich. In Anbetracht von Entgiftungsprozessen, DNA-Reparatur, Apoptose und der Kontrolle von neoplastisch transformierten Zellen durch das Immunsystem ist es denkbar, dass derzeit das Risiko durch Acrylamid in Bezug auf sein kanzerogenes Potential überschätzt wird [Dybing und Sanner, 2003]. Für genotoxische Kanzerogene wird im Lebensmittelbereich das ALARA-Prinzip (As-Low-As-Reasonably-Achievable) angewendet, mit dem Ziel, durch die Reduzierung des Gehaltes der betreffenden Substanz die Belastung möglichst gering zu halten (precautionary principle) [BfR, 2003a]. Neueste Überlegungen ziehen jedoch in Betracht, auf Grund der erwähnten Schutzmechanismen im Niedrigdosisbereich, auch für genotoxische Kanzerogene einen Schwellenwert zu definieren, unterhalb dessen das Risiko einer Krebserkrankung als vernachlässigbar angesehen werden kann [Barlow *et al.*, 2006].

Bei einem Vergleich des LOAEL der kanzerogenen Wirkung im Tierversuch bei 500 µg/kg KG/Tag und der Aufnahmemenge für den Durchschnittsverzehrer von 0,5 µg/kg KG/Tag ergibt sich ein Faktor von 1000. Im Vergleich mit den entsprechenden Faktoren für andere Kanzerogene ist derjenige für Acrylamid relativ gering [Madle *et al.*, 2003]. Grundsätzlich ist zu beachten, dass eine Vielzahl potentiell kanzerogener Substanzen in behandelten Lebensmitteln („cooking carcinogens“) enthalten ist, die einen Einfluss auf die in der allgemeinen Bevölkerung vorhandenen Tumorzinidenzen vermuten lassen.

3.2 Blut

3.2.1 Funktion des Blutes

Das Blut macht als eines der größten Organe ungefähr 8% des Körpergewichtes aus. Es ist das wichtigste Transportmittel für den Stoffaustausch zwischen den Organen und nimmt eine wichtige Rolle bei Abwehr- und Reparaturprozessen ein. Eine Beteiligung am Fremdstoffmetabolismus ist durch die Enzymsysteme bestimmter Blutzellen wie den Erythrozyten (rote Blutkörperchen), Granulozyten und Monozyten (Leukozyten, weiße Blutkörperchen) gegeben. Die Fähigkeit zu gerinnen hilft Verluste bei Verletzungen zu minimieren. [Eisenbrand und Metzler, 2002, Marquardt und Schäfer, 2004]

3.2.2 Blutbildung und Zusammensetzung des Blutes

Blut besteht aus dem Blutplasma und verschiedenen Arten von Blutzellen. Das Plasma enthält pro Liter ca. 0,9 l Wasser, 9 g Elektrolyte und 70-80 g Proteine. [Eisenbrand und Metzler, 2002]

Die Blutzellen leiten sich aus einer pluripotenten Stammzelle ab. Die Differenzierung der Stammzellen in Vorläufer reifer Blutzellen erfolgt nur im intakten Knochenmark und steht unter Kontrolle von Faktoren, die mit dem Blut zum Knochenmark gelangen und dort die Bildung von Zellkolonien anregen. Die Vorläuferzellen vom Megaloblasten-Typ werden in der Gegenwart von bestimmten Hormonen, den Poetinen, weiter differenziert. [Marquardt und Schäfer, 2004]

3.2.2.1 Erythrozyten (Anzahl: 4,5-5,5 Mio/ μ l Blut)

Die unter dem Einfluss von Erythropoetin entstandenen Proerythroblasten reifen im Knochenmark mit zunehmender Hämoglobinsynthese zunächst zum basophilen Normoblasten und schließlich zum stärker hämoglobinhaltigen Normoblasten, der seinen Zellkern beim Übertritt in das Gefäßlumen durch Abschnürung verliert. Der reife Erythrozyt hat die Enzymsysteme des aeroben Stoffwechsels und der Proteinbiosynthese verloren. Er verfügt über die Fähigkeit, durch anaerobe Glykolyse (Embden-Meyerhof-Weg) Energie in Form von ATP zu gewinnen. Erythrozyten bestehen fast ausschließlich aus Hämoglobin. Sie haben eine flexible, bikonkave Scheibenform. Dies ist eine wichtige Voraussetzung, damit ein Erythrozyt bei einem Durchmesser von 8 μ m wiederholt die Mikrozirkulation passieren kann, deren

kleinste Querschnitte 3,5 mm betragen. Die Lebensdauer reifer Erythrozyten beträgt 120 Tage. Der Abbau findet in Milz und Leber statt. Fetale Erythrozyten werden bereits nach 60-80 Tagen abgebaut. Ein Mikroliter Blut enthält etwa 5 Millionen Erythrozyten. Der Hämokrit (Volumenanteil der Erythrozyten am Gesamtblutvolumen) ist geschlechtsspezifisch und beträgt 47% beim Mann und 42% bei der Frau. Die Hauptfunktion ist der Transport der Atemgase. [Eisenbrand und Metzler, 2002, Hoffbrand *et al.*, 2003, Marquardt und Schäfer, 2004]

3.2.2.2 Leukozyten (4000-8000/ μ l)

Die Leukozyten enthalten DNA und lassen sich in die beiden großen Gruppen der Phagozyten und Lymphozyten einteilen. Die Phagozyten lassen sich weiter in Granulozyten und Monozyten unterteilen. Unter normalen Bedingungen findet man in peripherem Blut nur reife Leukozyten, die zusammen mit den lymphatischen Organen das Immunsystem bilden. Nur etwa 5% der im Körper befindlichen Leukozyten zirkulieren mit dem Blut. Eine Eigenbeweglichkeit ermöglicht eine Durchwanderung der Wände der Blutkapillaren.

Die Granulozyten unterteilen sich ihrerseits aufgrund der Anfärbbarkeit der Granula noch einmal in neutrophile (polymorphkernig), eosinophile und basophile Granulozyten. Ihnen gemeinsam ist ein charakteristischer, mehrfach segmentierter Kern.

Lymphozyten (20-30% der Leukozyten) sind die Zellen der spezifischen Immunabwehr (zelluläre u. humorale Abwehr). Sie wandern vom peripheren Blut in das Gewebe von Lymphknoten oder Milz. An der Immunantwort sind zwei Arten von Lymphozyten beteiligt: die B- und T-Zellen. Beim Menschen haben die B-Zellen ihren Ursprung in Knochenmarksstammzellen und spielen vor allem in der Antigenpräsentation eine Rolle, da sie nach Reaktion mit Antigenen zusammen mit Plasmazellen die Immunglobuline bilden. Die T-Lymphozyten reifen im Thymus, stimulieren (T-Helferzellen) oder hemmen (T-Suppressorzellen) das Immunsystem und zerstören (T-Killerzellen) körpereigene virusinfizierte oder entartete Zellen in direktem Kontakt. [Hoffbrand *et al.*, 2003]

3.2.2.3 Thrombozyten (Anzahl: 150.000-300.000/ μ l)

Die Blutplättchen werden im Knochenmark durch Fragmentierung des Zytoplasmas der Megakaryozyten gebildet und als kernlose Plättchen ins Blut ausgeschwemmt. Thrombozyten zirkulieren 7-10 Tage im Blut und werden danach in der Milz

abgebaut. Sie sind wichtiger Bestandteil des Blutgerinnungssystems, indem sie sich bei Verletzungen an der Gefäßwand ablagern. Nach der Adhäsion als Reaktion auf eine Gefäßverletzung können Gerinnungsfaktoren des Plasmas selektiv adsorbiert werden. [Hoffbrand *et al.*, 2003]

3.2.2.4 Blutplasma

Als Blutplasma bezeichnet man Blut ohne Blutzellen. Es setzt sich zu 90% aus Wasser und zu 10% aus gelösten Stoffen zusammen, von denen 70% Plasmaproteine (Albumine, α -, β -, γ -Globuline), 20% niedermolekulare Stoffe (Nahrungsstoffe, Stoffwechselprodukte, Vitamine, Spurenelemente, Hormone, Enzyme) und 10% Elektrolyte (Na-, Ca-, Cl-, K-, Mg-, PO_4 -Ionen) sind. Der Begriff Blutserum bezeichnet Blutplasma ohne den Gerinnungsfaktor Fibrinogen. Die Hauptfunktionen des Plasmas sind Transportvorgänge und die Aufrechterhaltung des kolloidosmotischen Druckes. [Hoffbrand *et al.*, 2003]

3.2.3 Hämoglobin

Hämoglobin ist das Protein, das die Erfüllung der Hauptfunktion der Erythrozyten, den Transport von Sauerstoff in das Gewebe und den Rücktransport von Kohlendioxid, ermöglicht. Jeder Erythrozyt enthält etwa 640 Millionen Hämoglobinmoleküle. Hämoglobin A, der beim Erwachsenen dominierende Hämoglobintyp, ist ein Heterotetramer und besteht aus 2 Paaren unterschiedlicher Polypeptidketten $\alpha_2\beta_2$ mit jeweils einem Häm als prothetische Gruppe. Die α -Ketten bestehen aus je 141 Aminosäuren, die β -Ketten aus je 146 Aminosäuren. Das N-terminale Ende wird bei allen Ketten von der Aminosäure Valin gebildet. Es finden sich im Blut außerdem geringe Mengen von zwei anderen Hämoglobinen, Hb-F ($\alpha_2\gamma_2$) und Hb-A₂ ($\alpha_2\delta_2$). Mutationen des Globingens sind die weltweit häufigste Veränderung eines Einzelgens, von dem etwa 7% der Weltbevölkerung betroffen sind.

Die Hämsynthese findet hauptsächlich in den Mitochondrien statt. Der organische Teil des Häms besteht aus dem Protoporphyrin IX, in dem vier Pyrrolringe über Methylenbrücken verbunden sind und vier Methyl- sowie zwei Vinyl- und Propionatgruppen als Substituenten besitzen. Dieses ausgedehnte System konjugierter Doppelbindungen ruft die intensive Färbung des Blutes hervor. Ein zweiwertiges Eisenion im Zentrum des Ringsystems ist durch die vier Stickstoffatome der Pyrrolringe komplexiert, wobei vier der sechs möglichen Koordinationsstellen

besetzt sind. Das Eisenatom kann zweiwertig (Ferro-Hb) oder dreiwertig (Ferri-Hb, Met-Hb) vorliegen, wobei nur im ersten Fall eine Bindung zum Sauerstoff möglich ist. Die Bindung des Eisens an den Globinteil erfolgt durch Besetzung der fünften Koordinationsstelle durch einen Histidylrest der Helix F (proximales Histidin). Die sechste Koordinationsstelle kann nun Sauerstoff reversibel als weiteren Liganden aufnehmen. Ein weiterer Histidinrest (distales Histidin) stabilisiert diesen Komplex über eine Wasserstoffbrücke zum Sauerstoff. Eine Aufgabe der nahezu kugelförmigen Proteinhülle besteht darin, das Häm vor Oxidation des Fe^{2+} zu Fe^{3+} zu schützen. Die Proteinumgebung des Häms, insbesondere das distale Histidin, senkt außerdem die Affinität zu Kohlenmonoxid. Die Bindungsaffinität für CO im Vergleich zu O_2 ist so nur 200fach höher, beim isolierten Häm jedoch 25.000fach höher.

[Berg *et al.*, 2003, Hoffbrand *et al.*, 2003, Müller-Esterl, 2004]

3.3 Biomonitoring

3.3.1 Grundlagen

Die Entwicklung des Biomonitorings basiert auf dem Bestreben die menschliche Gesundheit vor toxischen Einflüssen zu schützen. Biomonitoring ist ein wichtiges Instrument zur Kontrolle der äußeren und inneren Exposition eines Organismus durch Chemikalien. Die Durchführung des Biomonitoring erfolgt durch die systematische Untersuchung biologischer Proben auf Schadstoffe oder deren Effektparameter. Besonders auf dem relativ jungen Gebiet der molekularen Epidemiologie ist die präzise Bestimmung der individuellen Exposition mit Chemikalien, insbesondere durch Kanzerogene, ein wichtiges Ziel [Watson und Mutti, 2004].

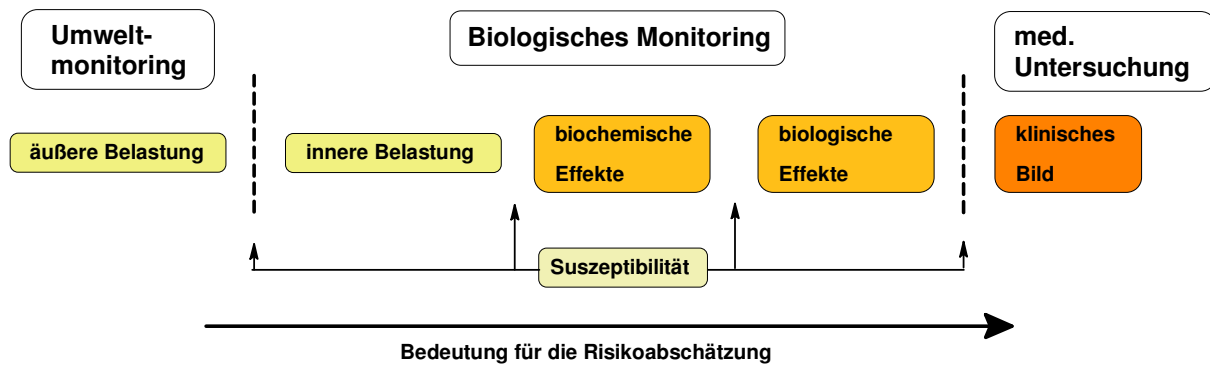


Abbildung 8: Zusammenhang zwischen Exposition, Effekten und Suszeptibilität

Die Konzentration von Substanzen in der Umwelt liefert ein Maß für die äußere Exposition, deren Erfassung als Umweltmonitoring bezeichnet wird. Eine Berücksichtigung der äußeren Exposition zur Abschätzung von Gesundheitsgefährdungen ist jedoch meist nicht möglich, da zwischen der äußeren Exposition und der tatsächlichen Aufnahme einer Substanz häufig keine eindeutige Korrelation besteht.

Die innere Exposition wird durch die Messung der von einem Organismus tatsächlich aufgenommenen Menge eines Stoffes oder seiner Metabolite in biologischem Material erfasst und liefert damit relevantere Erkenntnisse hinsichtlich einer Risikobewertung.

Der Zusammenhang zwischen äußerer und innerer Exposition kann unterschiedlich sein. Ist die äußere Exposition diskontinuierlich und variabel, kann die innere Exposition entweder durch wiederholte Messungen kurzlebiger Dosen oder als Integral einer kumulativen Exposition verfolgt werden. Der mit der inneren Exposition verknüpfte biologische Schaden ist abhängig von der Art der Substanz und ihrem Wirkmechanismus. Für akut wirksame Stoffe mit reversibler Interaktion mit den Zielstrukturen kann häufig die Konzentration im Blut mit dem biologischen Effekt korreliert werden (deterministischer Effekt). Dies gilt für Systeme mit hoher Umsatzrate oder schnellen Reparaturmechanismen. Bei Kumulation des Schadens, wie es bei genotoxisch wirksamen Substanzen durch irreversible Interaktion mit den Zielstrukturen der Fall ist, ist hingegen das Zeitintegral der Exposition relevant (stochastischer Effekt). Diese im Rahmen des Target-Dose-Konzeptes bestimmte biologisch wirksame Dosis („Target-Dosis“) kann aus den Reaktionsprodukten der reaktiven Metabolite mit der DNA oder anderen Makromolekülen abgeleitet werden. Ein Vorteil dieses Konzeptes ist die Berücksichtigung pharmakokinetischer Faktoren wie individuelle und speziesbedingte Stoffwechselunterschiede.

Das Belastungs-Beanspruchungskonzept unterscheidet die äußere und innere Exposition als Belastung (Belastungsmonitoring) von der durch die Erzeugung von Läsionen resultierenden Beanspruchung (Effektmonitoring) als Folge der Belastung. Es wird ferner zwischen biochemischem und biologischem Effektmonitoring unterschieden. Der Begriff Biomonitoring umfasst sowohl Belastungs- als auch Effektmonitoring.

Bei der Kontrolle der inneren Exposition als Zielvorgabe, sollte die Komponente gemessen werden, die am besten mit der Höhe der Exposition korreliert. Für eine Abschätzung der Gesundheitsgefährdung eines Individuums, sollte die biologisch wirksame Komponente erfasst werden. In diesem Zusammenhang ist der Begriff Biomarker von Bedeutung, der eine mit möglichst geringem Aufwand aus einem lebenden Organismus entnommene Probe bezeichnet, die Aussagen über das gesundheitliche Risiko chemischer Substanzen ermöglicht. [Marquardt und Schäfer, 2004]

3.3.2 Biomarker

Der Nutzung von Biomarkern kommt eine wachsende Bedeutung in der toxikologischen und humanmedizinischen Forschung zu [Watson und Mutti, 2004]. Unterschieden werden nach dem *Committee on Biological Markers in Environmental Health of the United States National Academy of Sciences and National Research Council* drei verschiedene Arten von Biomarkern: Expositionsbiomarker, Effektbiomarker und Suszeptibilitätsbiomarker (Abbildung 8).

Wichtige Voraussetzungen für eine Eignung als Biomarker sind eine ausreichend spezifische analytische Methode und eine metabolische Spezifität, d.h. der Analyt leitet sich ausschließlich von der interessierenden Ausgangssubstanz ab. Ebenfalls wichtig ist die Spezifität des Ursprungs einer Exposition. Für die Mehrzahl der interessierenden Substanzen in der Arbeitsmedizin ist die beruflich bedingte Exposition jedoch nicht die einzige Expositionsquelle. Expositionsbiomarker sind jedoch nicht geeignet, um den Ursprung einer Exposition zu identifizieren. Zu diesem Zweck eignet sich der Konzentrationsunterschied des Biomarkers zwischen exponierten Individuen und der Allgemeinbevölkerung. Dabei bezeichnet man üblicherweise ein Individuum bei Überschreitung eines Referenzwertes, abgeleitet als 95stes Perzentil der Werte der Referenzpopulation, als exponiert. Aufgrund der Überlappung des Wertebereichs der exponierten Gruppe mit dem der Referenzgruppe eignen sich Expositionsbiomarker eher zur Identifizierung von

exponierten Gruppen als von exponierten Individuen. Geringe beruflich bedingte Expositionen stellen folglich hohe Anforderungen an die verwendete Analytik. Expositionsbiomarker liefern auch keine Informationen zur Expositionsroute, was für Substanzen mit systemischen Effekten von Vorteil ist, jedoch bei Substanzen mit lokalen Effekten eine potentielle Quelle für Fehlinterpretationen darstellt. Eine quantitative Expositionsbeurteilung basiert ferner auf der genauen Kenntnis der quantitativen Beziehung zwischen gemessener externer Exposition und dem Expositionsbiomarker, die vor allem bei dermalen Exposition häufig nicht vorhanden ist. Die Addukte von genotoxischen Kanzerogenen mit Makromolekülen stellen wichtige Expositionsbiomarker dar. Eine weite Anwendungsbreite bietet die Messung von Addukten in Hämoglobin und Lymphozyten-DNA, deren Adduktbildung korrelieren kann. Vorteile für die Verwendung von Hämoglobin sind die gut bekannte Kinetik der Adduktbildung sowie das Fehlen von Reparaturmechanismen, die bei der Erfassung von DNA-Addukten berücksichtigt werden müssen. Eine Grundvoraussetzung für den sinnvollen Einsatz von Expositionsbiomarkern im Rahmen der gesundheitsbezogenen Risikobewertung ist die Kenntnis von Dosis-Wirkungsbeziehungen. Die nötigen Informationen können aus epidemiologischen oder klinischen Studien mit Langzeitexposition und Langzeit-Follow-up gewonnen werden [Aitio, 1999, Aitio und Kallio, 1999].

Effektbiomarker (Biomarker der Wirkung) werden definiert als Indikatoren für die Veränderung einer endogenen Komponente eines biologischen Systems, als Maßeinheit für die Veränderung der funktionellen Kapazität eines biologischen Systems oder eines veränderten Zustands eines solchen Systems, der sich als Beeinträchtigung oder Krankheit charakterisieren lässt. Effektbiomarker befinden sich im Grenzbereich zwischen Gesundheitsüberwachung und dem Monitoring von exponierten Populationen. Besondere Bedeutung kommt den Biomarkern der genotoxischen Effekte zu, die häufig mit zytogenetischen Methoden erfasst werden, wie z.B. Chromosomenaberrationen, Mikronuklei, Schwester-Chromatid-Austauschvorgänge und die Detektion von Punktmutationen mit Hilfe des HPRT-Tests. Der Zusammenhang einer erhöhten Anzahl von Chromosomenaberrationen und einem erhöhten Krebsrisiko wurde in zwei Kohortenstudien nachgewiesen. Effektbiomarker haben sich in vielen Fällen als hilfreich bei der Identifikation von exponierten Populationen erwiesen, obwohl sie in der Regel nicht-spezifisch bezüglich des adversen Agens sind. Es ist jedoch gerade beim Arbeitsplatzmonitoring häufig möglich andere Einflussfaktoren auszuschließen, so dass eine relative Spezifität erreicht werden kann. Wachsende Bedeutung erlangen die häufig Agens-

spezifischen Addukte mit der DNA, die wie bereits erwähnt auch Aussagen über die Exposition eines Organismus ermöglichen. [Aitio, 1999, Aitio und Kallio, 1999]

Biomarker der Suszeptibilität (Empfindlichkeit) reflektieren die Unterschiede in der Sensitivität verschiedener Menschen gegenüber Chemikalien, da bei ähnlichen Expositionsbedingungen nicht alle Menschen gesundheitliche Beeinträchtigungen erfahren und die Schwere eines adversen Effektes erheblich variieren kann. Grund dafür sind genetisch bedingte individuelle Unterschiede im Gleichgewicht enzymkatalysierter Reaktionen, die aktive Spezies generieren und solchen, die zu einer Detoxifizierung führen. Die Messungen der Aktivität solcher Enzymsysteme, die Xenobiotika metabolisieren, dienen als Biomarker der Suszeptibilität. Von diesen Enzymsystemen sind vor allem Cytochrom P-450 abhängige Monooxygenasen (CYP), Glutathione S-Transferasen (GST) und N-Acetyltransferasen (NAT) von großer Relevanz und gut untersucht. Detailliertere Erkenntnisse liefern auf der Basis des Genotyps erstellte Studien [Aitio, 1999]. Bei einem multifaktoriellen und mehrschrittigen Prozess wie der Kanzerogenese ist es jedoch erforderlich neben der Suszeptibilität, bedingt durch genetische Polymorphismen, auch die Analyse von biologischen Effekten miteinzubeziehen. Es wurde aufgezeigt, dass empfindliche Individuen eine erhöhte Induktion von DNA-Addukten und Chromosomenaberrationen aufweisen, was zu höheren Mutationsraten und damit potentiell zur Entstehung von Krebs führen kann [Au *et al.*, 2001]. Viele Studien, die eine Verbindung von genetischen Polymorphismen und bestimmten Krankheiten, vor allem mit der Exposition durch Mutagene oder Kanzerogene assoziierte Krebserkrankungen, aufzeigen sollten, lieferten jedoch keine reproduzierbaren Ergebnisse [Au und Salama, 2005].

Tabelle 4: Biomonitoring im Belastungs-Beanspruchungskonzept [Marquardt und Schäfer, 2004]

Äußere Belastung	Umwelt-Monitoring Human-Monitoring	Stoff in der Umgebungsluft (Belastung der Population); aufgenommener Stoff (Belastung des Individuums)
Innere Belastung	Belastungsmonitoring (Exposition)	Stoff-, Metabolitenkonzentration in biologischem Material (Blut, Harn, Ausatemluft)
Beanspruchung	Effekt-Monitoring	Biochemische Effekte (DNA-Addukte,

		Proteinaddukte); biologische Effekte (Mutationen, Mikronuklei, SCE, CA)
	Suszeptibilitäts-Monitoring	genetische Polymorphismen, DNA-Reparatur

Für eine bestimmte Substanz können mehrere verschiedene Biomarker verfügbar sein. Ist der Mechanismus des adversen Effektes bekannt, kann die Auswahl des am besten geeigneten Biomarkers auf der Basis von kinetischen Parametern erfolgen (Abbildung 9).

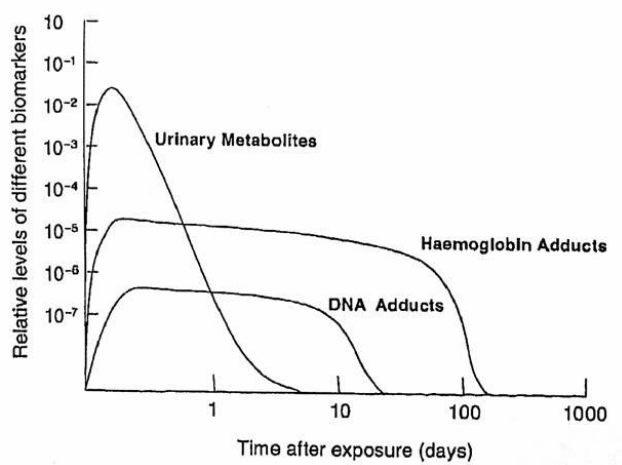


Abbildung 9: Monitoringzeiträume für Mercaptursäuren, Hämoglobin- und DNA-Addukte nach singulärer Exposition [Watson und Mutti, 2004]

3.3.3 Quellen von Biomarkern

Die Analytik von Biomarkern findet meist in Ausscheidungsprodukten – hier vorrangig Harn – und in Blut statt (nicht-invasive Probennahme). Expositionskontrollen über die Ausatemluft sowie die Verwendung von Muttermilch, Haaren und Zähnen zur Beantwortung spezieller Fragestellungen gehören ebenso dazu. Eine nicht-invasive Quelle für Zellmaterial stellen vereinzelt abgeschilferte Zellen der Mundschleimhaut sowie Zellen des Nieren- und Blasenepithels im Harn dar.

Harn ist geeignet für die Bestimmung von hydrophilen Substanzen und deren Metaboliten. Ein Nachteil ist die von vielen Randbedingungen abhängige variable Harnproduktion, so dass eine Untersuchung von 24 h-Sammelharn am zuverlässigsten ist.

Blut spiegelt als zentrales Kompartiment am besten die innere Belastung wider, da die meisten und auf beliebigem Weg aufgenommenen Substanzen dort nachgewiesen werden können. Es ist das erste Target nach der Aufnahme über die Nahrung. Ein Vorteil des Blutes ist die individuell wenig variable Zusammensetzung, während die invasive Probenahme und die schnelle Veränderung nach der Entnahme als nachteilig anzusehen sind. Die Verteilung von Fremdstoffen im Blut hängt wesentlich von ihrer Fähigkeit durch Zellmembranen zu diffundieren und an Plasmaproteine zu binden ab [Marquardt und Schäfer, 2004].

3.3.4 Protein-Addukte

3.3.4.1 Hämoglobin-Addukte

Im Fall der Adduktbildung mit Proteinen steht der Begriff Addukt für den kovalent an ein Protein gebundenen Rest als Konsequenz der Reaktion mit einem elektrophilen Agens [Tornqvist *et al.*, 2002]. Die meisten elektrophilen Xenobiotika reagieren mit den nukleophilen Zentren des Hämoglobins. Dies sind der Imidazol-Stickstoff in Histidinresten, Schwefelatome in Cystein- und Methioninresten, Sauerstoffatome in Carboxyl- und Hydroxylgruppen von Tyrosin- und Serinresten und das α -Stickstoffatom der N-terminalen Valinreste an allen vier Ketten des humanen Hämoglobins [Marquardt und Schäfer, 2004, Rydberg *et al.*, 2002]. Bei der direkten analytischen Erfassung elektrophiler Substanzen besteht das Problem, dass die biologische Halbwertszeit *in vivo* sehr kurz sein kann, so dass die analytische Erfassung stabiler Reaktionsprodukte wie den Protein-Addukten viele Vorteile bietet [Tornqvist *et al.*, 2002]. Seit den 1970er Jahren kommt den Protein-Addukten deshalb für das *in vivo* Monitoring von Expositionen möglicher Kanzerogene eine wachsende Bedeutung zu [Ehrenberg und Tornqvist, 1991, Tornqvist *et al.*, 2002]. Einer der frühesten Anwendungen war eine Studie zur Untersuchung von mit Ethylenoxid exponierten Arbeitern [Calleman *et al.*, 1978].

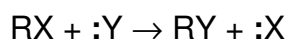
Dem N-terminalen Valin kommt in analytischer Hinsicht eine besondere Bedeutung zu. Mit Hilfe des modifizierten Edman-Abbaus ist es möglich diese das Elektrophil tragende Aminosäure selektiv abzuspalten oder im Fall von hydrolysierbaren Addukten den gebundenen Rest hydrolytisch abzutrennen. In weiteren Aufreinigungsschritten werden die Derivate angereichert und z. B. mit Gaschromatographie/Massenspektrometrie quantifiziert. Die Empfindlichkeit dieser Methodik liegt bei vielen Methoden zwischen 1-10 pmol Addukt pro g Hämoglobin [Marquardt und Schäfer, 2004, Rydberg *et al.*, 2002]. Es wurden u.a. Methoden für

die Bestimmung von 1,3-Butadien, Acrylamid und aromatischen Aminen erstellt [Albertini *et al.*, 2001, Bergmark *et al.*, 1993, Richter und Branner, 2002]. Neben dem endständigen Valin finden auch hydrolysierbare Cystein-Addukte von vielen Arylaminen und Nitroaromaten als Biomarker Anwendung. Die Verwendung von Hämoglobin bietet viele Vorteile. So sind die Addukte in der Regel in vivo stabil und Blut als Quelle des Hämoglobins ist gut verfügbar. Aufgrund der Lebensdauer der Erythrozyten beim Menschen von 120 Tagen und der nicht vorhandenen Reparaturmechanismen, reflektieren die gemessenen Adduktgehalte einen Querschnitt der Exposition über diesen Zeitraum [Marquardt und Schäfer, 2004].

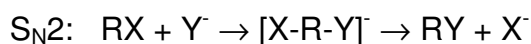
Durch methodische Fortschritte auf dem Gebiet der Hämoglobin-Addukte wurden zahlreiche sog. Hintergrundbelastungen von alkylierenden Substanzen in Form ihrer Addukte im Humanblut nachgewiesen und auch quantifiziert, für die bisher keine toxikologischen Schwellenwerte definiert werden können. Im Hinblick auf eine Risikobewertung dieser Substanzen kommt der Bestimmung der Hämoglobinaddukte als Biomarker der Exposition eine große Bedeutung zu [Ehrenberg und Tornqvist, 1991].

3.3.4.2 Mechanismen und Kinetik der Adduktbildung

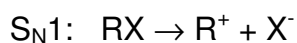
Für die meisten elektrophilen Reagenzien (RX) ist die nukleophile Substitution der der Adduktbildung zugrunde liegende Reaktionsmechanismus. Die reaktiven Zentren des Nukleophils (Y) und die Abgangsgruppe (X) können neutral oder negativ geladen sein. Die Bildung der Addukte erfolgt nach der folgenden Gleichung:

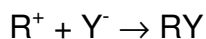


Prinzipiell sind zwei verschiedene Mechanismen möglich, welche unterschiedliche Kinetiken aufweisen. Bei der S_N2-Reaktion (bimolekular) wird ein aktivierter Zwischenkomplex von RX und Y gebildet und die Reaktionsrate ist abhängig von der Konzentration beider beteiligter Reaktanden.



Bei S_N1-Reaktionen (monomolekular) wird aus dem Elektrophil durch Dissoziation zunächst ein reaktives kationisches Intermediat (R⁺) gebildet, das dann schnell mit dem Nukleophil reagiert. Die erste dieser Reaktionen verläuft langsam und ist damit geschwindigkeitsbestimmend.





Viele elektrophile Substanzen reagieren nach einer Kombination beider Mechanismen, bei starken Nukleophilen jedoch vorrangig nach S_N2 . Oxirane wie Glycidamid reagieren unter neutralen und basischen Bedingungen nach dem S_N2 -Mechanismus, während im sauren Milieu die Reaktion tendenziell einen S_N1 -Charakter aufweist [Tornqvist *et al.*, 2002]. Elektrophile mit aktivierten Doppelbindungen, z. B. α,β -ungesättigte Carbonylverbindungen zu denen auch Acrylamid gehört, reagieren über eine 1,4-Addition (Michael-Addition) mit Nukleophilen [Tornqvist *et al.*, 2002].

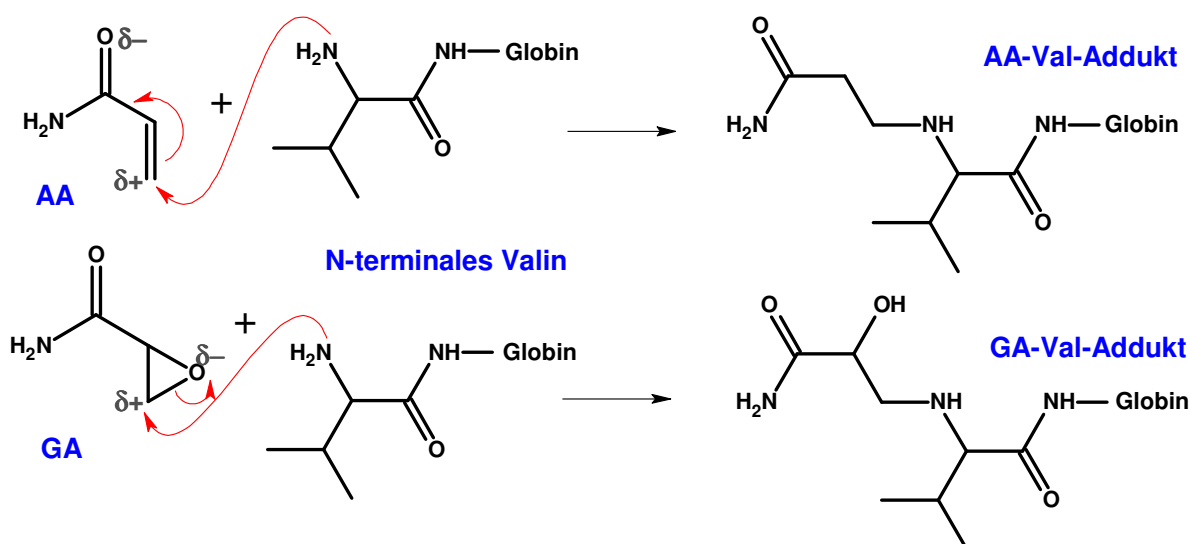


Abbildung 10: Mechanismen der Adduktbildung am Beispiel von Acrylamid (1,4-Addition) und Glycidamid (nukleophile Substitution) mit dem N-terminalen Valins des Hb

Die n-Werte, welche die nukleophile Reaktivität gegenüber elektrophilen Substanzen beschreiben (mit H_2O als definiertem Nullwert), nehmen in biologischen Makromolekülen in der folgenden Reihenfolge zu: DNA ≈ 2 , Guanin-N7 $\approx 3,5$, Protein-NH₂ $\approx 4-5$, Protein-SH $\approx 5-6$ [Ross, 1962]. Nukleophile Zentren verfügen nur im unprotonierten Zustand über ihre normale Reaktivität [Tornqvist *et al.*, 2002]. Im Hämoglobin verfügen drei Aminosäuren über nukleophile Zentren mit pK_a -Werten im Bereich des Blut-pH-Wertes (7,4). Dies sind die Stickstoffatome der N-terminalen Reste (α -Kette 7,8, β -Kette 6,8), die Imidazol-Stickstoffatome der Histidinreste (5,6-7,0) und die Thiol-Schwefelatome der Cysteine (7,9-8,5) [Ross, 1962].

Die Höhe des Adduktlevels hängt ab von der Reaktivität eines Elektrophils gegenüber einem bestimmten Nukleophil, der Konzentration und Persistenz des

Elektrophils sowie der Stabilität des entstandenen Adduktes und der Lebensdauer des Monitor-Moleküls [Tornqvist *et al.*, 2002].

3.3.4.3 Serumalbumin

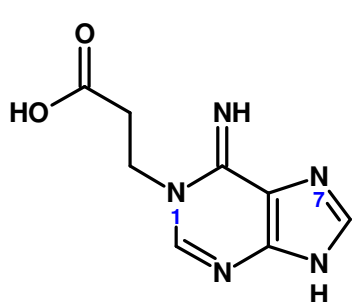
Serumalbumin stellt mit einem Gehalt von ca. 42 mg/ml Blut ebenfalls eine gute Quelle für Adduktmessungen dar. Die Bindung an das Serumalbumin kann im Vergleich zum Hämoglobin höher sein. Aufgrund der Halbwertszeit des Serumalbumins beim Menschen von 19 Tagen, ist der kumulative Effekt geringer ausgeprägt als beim Hämoglobin. Die Serumalbuminaddukte spiegeln außerdem deutlicher den Aktivierungsstoffwechsel in der Leber wider, da sie zumindest teilweise in der Leber gebildet und erst dann in den Blutkreislauf entlassen werden. Ein Vorteil von Albuminaddukten ist, dass reaktive Metaboliten mit diesem Protein direkt im Blutstrom reagieren können, ohne vorher eine Zellmembran passieren zu müssen. So lassen sich aus einem Vergleich der Adduktmuster vom Hämoglobin- und Serumalbumin Informationen über den Stoffwechselstatus eines Individuums gewinnen [Marquardt und Schäfer, 2004, Watson und Mutti, 2004].

3.3.5 DNA-Addukte

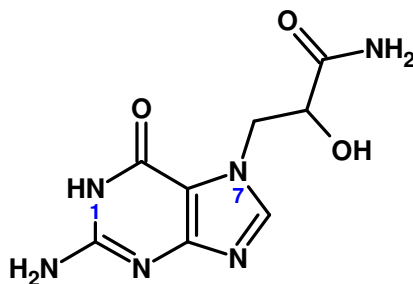
Die Bedeutung von DNA-Addukten basiert auf der Tatsache, dass die kovalente Bindung von genotoxischen Stoffen an die DNA häufig der erste Schritt im Prozess der Kanzerogenese darstellt. Es besteht eine gute Korrelation der DNA-Adduktbildung mit der biologisch wirksamen Dosis [Marquardt und Schäfer, 2004]. Das Ausmaß des DNA-Schadens resultiert aus der Konkurrenz von DNA-Adduktbildung und Reparatur-Mechanismen. Jedes Addukt hat eine charakteristische Wirksamkeit in Bezug auf die Induktion von Mutagenität [Jeffrey und Williams, 2005]. Wichtige Verfahren zur Erfassung von DNA-Addukten sind die ³²P-Postlabeling-Methode, immunologische Methoden sowie der Einsatz massenspektrometrischer Methoden nach Abspaltung der Addukte durch thermisch-neutrale Hydrolyse [Marquardt und Schäfer, 2004]. Aus der Nahrung stammende DNA-reaktive Kanzerogene können aus einer Vielzahl verschiedener Quellen stammen. Häufig findet eine Bioaktivierung von ursprünglich nicht-DNA-reaktiven Spezies statt. [Jeffrey und Williams, 2005].

Acrylamid zeigte in *in vitro* Versuchen nur eine schwach ausgeprägte Tendenz zur Bildung von Addukten mit der DNA. Dabei reagierte Acrylamid vorrangig mit dem N-1 des Adenins, nur zu 14% fand eine Reaktion mit dem N-7 des Guanins statt

[Solomon *et al.*, 1985]. N7-(2-Carbamoyl-2-hydroxyethyl)-guanin (N7-GA-Gua) ist das vorwiegend gebildete DNA-Addukt, das aus der Reaktion von Glycidamid mit der DNA resultiert [Seegerback *et al.*, 1995]. N3-(2-Carbamoyl-2-hydroxyethyl)-adenin (N3-GA-Ade) und N1-(2-Carbamoyl-2-hydroxyethyl)-adenin (N1-GA-Ade) sind weitere *in vitro* gebildete DNA-Addukte von Glycidamid. Die Bildung von N7-GA-Gua und N3-GA-Ade konnte auch *in vivo* in Mäusen beobachtet werden. N3-GA-Ade wurde in 50-100-fach geringeren Mengen als N7-GA-Gua gefunden [Gamboa da Costa *et al.*, 2003]. N7-GA-Gua und N3-GA-Ade sind promutagen, da sie einer spontanen Depurinierung unterliegen können. Die entstehenden abasischen Stellen ermöglichen den Einbau von Deoxyadenosin während der DNA-Replikation, was zu die G-T-Transversionen (G:C → T:A) führt [Besaratina und Pfeifer, 2005, Zeynep Atay *et al.*, 2005]. Die Bildung von N7-GA-Gua hat einen wichtigen Anteil am kanzerogenen Potential von Acrylamid [Besaratina und Pfeifer, 2005].



N1-(2-Carboxyethyl)-adenin



N7-(2-Carbamoyl-2-hydroxyethyl)-guanin

Abbildung 11: Chemische Strukturen der dominanten DNA-Addukte von Acrylamid und Glycidamid [Besaratina und Pfeifer, 2005]

3.3.6 Biomonitoring von Acrylamid mittels Hämoglobinaddukten

Verschiedene Studien wurden veröffentlicht, welche die Erfassung der Exposition mit Acrylamid zum Ziel haben. Um die durchschnittliche langfristige Exposition mit Acrylamid zu erfassen, wurden die Hämoglobinaddukte von Acrylamid als Biomarker für die innere Belastung genutzt. Dabei waren verschiedene Personenkollektive Gegenstand der Untersuchung. In Arbeitsplatzstudien wurde die Exposition von Beschäftigten mit Acrylamid-Kontakt untersucht, andere Studien haben die Erfassung der Exposition der Allgemeinbevölkerung mit Acrylamid als Zielsetzung. Dabei wurden auch Unterschiede in der Exposition zwischen Nichtrauchern und Rauchern miterfasst.

3.3.6.1 *Biomonitoring von Acrylamid am Arbeitsplatz*

Bergmark et al. führten 1993 eine erste Arbeitsplatzstudie zur Acrylamid-bedingten Exposition von chinesischen Arbeitern, die mit der Produktion von Polyacrylamid beschäftigt waren, durch. Dabei wurde Acrylamid in einer der zehn Personen der Kontrollgruppe detektiert. Die Acrylamid-Hämoglobinadduktgehalte der exponierten Arbeiter lag zwischen 0,3-34 nmol/g Hb (300-34000 pmol/g Hb). Im Rahmen dieser Studie wurde auch das entsprechende Glycidamid-Hämoglobinaddukt von Glycidamid nach erfolgter Säurehydrolyse mit 1,6-32 nmol/g Hb (1600-32000 pmol/g Hb) quantifiziert [Bergmark *et al.*, 1993]. Unter Verwendung derselben Probanden zeigten Calleman et al., dass die gemessenen Acrylamid-Adduktgehalte eine gute Korrelation mit einem spezifisch für die durch Acrylamid induzierte periphere Neuropathie entwickelten Neurotoxizitätsindex aufwies. Die periphere Neuropathie war im Synthesebereich, in dem das Monomer gehandhabt wurde, am deutlichsten ausgeprägt und die durchschnittlichen Acrylamid-Adduktgehalte am höchsten (13400 pmol/g Hb). Die aus diesem Adduktgehalt errechnete durchschnittliche *in vivo* Dosis von 6 mM/h entspricht einer täglichen Aufnahme von 1500 µmol Acrylamid [Calleman *et al.*, 1994].

Bergmark et al. untersuchten die Acrylamid-Belastung von Laborpersonal, zu dessen Aufgabenbereich das Arbeiten mit Polyacrylamid-haltigen Gelen für die Gelelektrophorese (PAGE) gehört. Die PAGE-Arbeiter wiesen mit 54 pmol/g Hb deutlich höhere Acrylamid-Adduktgehalte als die Kontrollgruppe der Nichtraucher auf, die überraschenderweise einen Adduktgehalt in Höhe von 31 pmol/g Hb aufwies. Der Ursprung dieser gemessenen Hintergrundbelastung konnte zu diesem Zeitpunkt nicht erklärt werden, jedoch wurden bereits Lebensmittel als mögliche Expositionsquelle angedacht. Die Acrylamidaufnahme der Nichtraucher wurde mit 0,8 µg/kg KG/Tag geschätzt. Der Adduktgehalt von 116 pmol/g Hb in der Kontrollgruppe der Raucher führte zu der Vermutung, dass Acrylamid eine Komponente des Tabakrauches sei. Es wurde eine Erhöhung des Acrylamid-Adduktgehaltes von 6 pmol/g Hb pro Zigarette pro Tag abgeschätzt. Für die Bestimmung der Hintergrundbelastung an Glycidamid-Addukten nach erfolgter Säurehydrolyse erwies sich die angewendete Methodik als nicht sensitiv genug [Bergmark, 1997].

Im Rahmen der Entwicklung einer Methode für die simultane Bestimmung der Hb-Addukte von Acrylamid und Glycidamid wurden von Pérez et al. Proben von 11 mit Acrylamid exponierten koreanischen Arbeitern gemessen. Das Glycidamid-Addukt wurde direkt unter Verwendung des modifizierten Edmanabbaus und anschließender Acetylierung erfasst. Die Acrylamid-Adduktgehalte der Arbeiter im Synthesebereich

lagen im Bereich von 27-1854 pmol/g Hb (Median 441 pmol/g Hb) und damit höher als im Laborbereich mit 74-645 pmol/g Hb (Median 136 pmol/g Hb). Die Glycidamid-Addukte zeigten Werte in Höhe von 3 bis 12 % der Acrylamid-Adduktgehalte und betrugen 2-177 pmol/g Hb (Median 36 pmol/g Hb) im Synthesebereich und 5-68 pmol/g Hb (Median 10 pmol/g Hb) im Laborbereich. Auf Grund fehlender Daten für die externe Exposition konnte jedoch kein Bezug zwischen externer Exposition und *in vivo* Dosis hergestellt werden [Perez *et al.*, 1999].

In Folge eines Wassereinbruchs bei Tunnelarbeiten durch den schwedischen Hallandsås-Bergrücken im Jahr 1997, bei dem das acrylamid-haltige Dichtungsmittel Rhoca GilTM unvollständig polymerisierte, wurde Acrylamid in größeren Mengen freigesetzt (92 mg/L in einem nahegelegenen Bach) und sorgte für toxische Effekte bei Kühen, Fischen sowie den exponierten Tunnelarbeitern. Insgesamt 210 der exponierten Tunnelarbeiter wurden einer medizinischen Untersuchung unterzogen, die auch die Erfassung der Acrylamid-Hämoglobinaddukte umfasste. Da das ebenfalls im Dichtungsmittel vorhandene N-Methylacrylamid zur Bildung des identischen Adduktes N-(2-Carbamoyl-ethyl)valin führt, wurde berücksichtigt, dass N-Methylacrylamid ein Drittel des Addukt-Levels einer äquivalenten Menge Acrylamid bildet. Die Acrylamid-Adduktgehalte der 18 Probanden in der Nichtraucher-Kontrollgruppe variierte im Bereich von 0,02-0,07 nmol/g Hb (20-70 pmol/g Hb). 47 der Tunnelarbeiter wiesen ein Acrylamid-Adduktlevel innerhalb des Bereichs der Kontrollgruppe auf, während 163 der Tunnelarbeiter überhalb dieses Bereichs lagen, davon 74 Personen mit einem Acrylamid-Adduktgehalt von 0,3 nmol/g Hb (300 pmol/g Hb). Ein Extremwert von 17,7 nmol/g Hb (17700 pmol/g Hb) wurde gefunden. In dieser Studie wurde eine signifikante Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen der Höhe des Acrylamid-Adduktgehalts und dem Auftreten von Symptomen des peripheren Nervensystems, Irritationen von Haut, Auge und Atmungstrakt sowie Symptomen wie Kopfschmerzen, Übelkeit und Schwindel belegt. 39 % der Probanden mit einem Acrylamid-Adduktgehalt oberhalb von 1 nmol/g Hb (1000 pmol/g Hb) zeigten Symptome wie Kribbeln oder Taubheit ihrer Hände oder Füße (Parästhesie). Auf dieser Basis konnten folgende Schwellenwerte abgeleitet werden: 0,51 nmol/g Hb für Taubheit oder Kribbeln von Füßen oder Beinen; 1,28 nmol/g Hb für Abschälen der Haut an den Händen sowie 1,86 nmol/g Hb für Beinkrämpfe. 26 Arbeiter mit neurotoxischen Symptomen des peripheren Nervensystems und einem Adduktgehalt über 0,3 nmol/g Hb (300 pmol/g Hb) nahmen bis zur Symptommfreiheit an weiteren Untersuchungen nach 6, 12 und

18 Monaten teil. Nach 18 Monaten wiesen nur noch 2 Probanden Symptome auf [Hagmar *et al.*, 2001].

Schettgen *et al.* untersuchten die Hämoglobinaddukte von Ethylenoxid, Propylenoxid, Acrylnitril und Acrylamid in 62 Arbeitern (38 Raucher, 24 Nichtraucher) einer Fabrik, in der Oberflächenbehandlungsmittel für Textilien hergestellt werden. Die Gruppe der exponierten Arbeiter wies Acrylamidaddukt-Level zwischen < 11 (Detektionsgrenze) und 294 pmol/g Hb (Median 63 pmol/g Hb) auf und unterschied sich damit deutlich von der Kontrollgruppe (2 Raucher, 8 Nichtraucher) mit Adduktgehalten zwischen 16 und 90 pmol/g Hb (Median 28 pmol/g Hb) [Schettgen *et al.*, 2002].

In einer arbeitsmedizinischen Studie wurde eine signifikante Korrelation zwischen der Exposition durch inhalativ aufgenommenes Acrylamid und Acrylamid-Hämoglobinaddukten sowie zwischen der auf Arbeitshandschuhen gemessenen Exposition und Acrylamid-Hämoglobinaddukten festgestellt [Jones *et al.*, 2006].

Drei Fallstudien, bei denen Hämoglobinaddukte in der Untersuchung von einer potentiellen Belastung mit Acrylamid am Arbeitsplatz verwendet wurden, wurden von Paulsson *et al.* beschrieben. In einem der beschriebenen Fälle, bei dem die betroffene Person in Folge einer 15-jährigen Tätigkeit mit einem Acrylamid-haltigen Dichtungsmittel neurotoxische Symptome zeigte, wurde ein Acrylamid-Adduktlevel von 23 nmol/g Hb (23000 pmol/g Hb) gefunden und die Exposition mit Acrylamid eindeutig als Ursache der neurotoxischen Symptome diagnostiziert. 5 Monate nach Auswechslung des Acrylamid-haltigen Dichtungsmittels durch ein Acrylamid-freies Produkt sank das Acrylamid-Adduktlevel um den Faktor 10 auf 2,4 nmol/g Hb (2400 pmol/g Hb). Der Proband zeigte einen Monat zuvor eine Polyneuropathie in den Beinen und Unterarmen. Ein Jahr nach dem erfolgten Produktwechsel war der Acrylamid-Adduktgehalt auf 0,41 nmol/g Hb (410 pmol/g Hb) abgesunken. Bei einem Raucher mit einem täglichen Zigarettenkonsum von ca. 20 Zigaretten pro Tag wird von einem Adduktgehalt von ca. 0,2 nmol/g Hb ausgegangen. Da der Proband weiterhin neurotoxische Symptome zeigte, konnte ein irreversibler Nervenschaden durch die hohe und langandauernde Exposition mit Acrylamid nicht ausgeschlossen werden [Paulsson *et al.*, 2006].

3.3.6.2 *Biomonitoring von Acrylamid in der allgemeinen Bevölkerung*

Bei der Entdeckung der Belastung der allgemeinen Bevölkerung mit Acrylamid kam der Bestimmung des Acrylamid-Adduktgehaltes unter Verwendung des modifizierten Edman-Abbaus und GC/MS-Technik eine wichtige Rolle zu. So wurde die

Hintergrundbelastung mit Acrylamid das erste Mal in der Nichtraucher-Kontrollgruppe der Arbeitsplatzstudie von Bergmark et al. entdeckt [Bergmark, 1997]. Studien, die sich ausschließlich mit der Exposition der allgemeinen Bevölkerung mit Acrylamid beschäftigten, folgten nach der Entdeckung der Bildung von Acrylamid in Lebensmitteln durch Tareke et al. [Tareke *et al.*, 2002].

Auf Grund der Schwierigkeiten bei der analytischen Quantifizierung des Glycidamid-Adduktes etablierten Paulsson et al. die Acetonisierung zur Derivatisierung der Hydroxyl- und Aminogruppe im Pentafluorphenylthiohydantoin-Derivat des GAVal (GAVal-PFPTH). Im Rahmen der Publikation wurden die AAVal- und GAVal-Addukte in den 5 Probanden der Kontrollgruppe bestimmt. Die Höhe der Adduktlevel betrug durchschnittlich 27 ± 6 pmol/g Hb für AAVal und 26 ± 6 pmol/g Hb für GAVal [Paulsson *et al.*, 2003a].

In einem Kollektiv von 13 Nichtrauchern und 16 Rauchern untersuchten Schettgen et al. die Gehalte an Acrylamid- und Glycidamid-Hämoglobinaddukten. In den Nichtrauchern fanden sie AAVal-Gehalte von 7-31 pmol/g Hb (Mittelwert 19 pmol/g Hb) und GAVal-Gehalte von 9-23 pmol/g Hb (Mittelwert 17 pmol/g Hb), während die Raucher deutlich höhere AAVal-Gehalte von 25-199 pmol/g Hb (Mittelwert 80 pmol/g Hb) und ebenfalls höhere GAVal-Gehalte von 22-119 pmol/g Hb (Mittelwert 53 pmol/g Hb) aufwiesen. Diese Ergebnisse wurden mit externer Kalibrierung erzielt. Die Autoren schlossen aus dem Verhältnis von AAVal:GAVal von 1:0,96 in Nichtrauchern und 1:0,73 in Rauchern, dass der Metabolismus von Acrylamid zu seinem Metaboliten Glycidamid in Nichtrauchern effektiver sei als in Rauchern und die enzymatische Kapazität des oxidativen Metabolismus limitiert ist oder alternativ eine Induktion von Epoxidhydrolasen aufzeigt, bei der Glycidamid zu 2,3-Dihydroxypropionamid (Glyceramid) detoxifiziert wird. Die hohe Variabilität des GAVal/AAVal-Verhältnisses spiegelt vermutlich den Einfluss der individuellen Suszeptibilität wider [Schettgen *et al.*, 2004b].

Zur Klärung des Ausmaßes der trans-plazentaren Exposition von neugeborenen Kindern durch Acrylamid führten Schettgen et al. eine Studie durch, bei der das Blut von 11 schwangeren Frauen (10 Nichtraucherinnen, 1 Raucherin) und das Nabelschnurblut der Neugeborenen hinsichtlich des Gehaltes an AAVal untersucht wurde. Der Acrylamid-Adduktgehalt der Mütter lag im Bereich von 18-104 pmol/g Hb (Median 21 pmol/g Hb), während im Nabelschnurblut Gehalte an AAVal von 6-43 pmol/g Hb (Median 10 pmol/g Hb) gefunden wurden. Die rauchende Mutter und das dazugehörige Nabelschnurblut wiesen deutlich erhöhte Werte auf (104 pmol/g Hb bzw. 43 pmol/g Hb). Die Gehalte des Acrylamid-Adduktes betragen ca. 50 % der

entsprechenden Gehalte im Nabelschnurblut. Auf Grund der kürzeren Lebensspanne des neonatalen Hämoglobin (80 Tage) und des geringeren Körpergewichtes der Neugeborenen deuten diese Gehalte jedoch auf eine mindestens genauso hohe *in vivo* Acrylamid-Dosis in den Neugeborenen hin. Die Autoren diskutieren, dass dies wegen der höheren Zellteilungsraten während der fötalen Entwicklung einen Grund zur Besorgnis darstellt [Marquardt und Schäfer, 2004, Schettgen *et al.*, 2004a].

Bahner *et al.* zeigten in einer Studie an einer Gruppe von 10 Hämodialysepatienten, dass diese Personengruppe keine Evidenz erhöhter Gehalte an Hämoglobinaddukten von Acrylamid aufweist, die auf eine Akkumulation von Acrylamid hindeuten würden. Die gemessenen Adduktlevel variierten zwischen 11-27 pmol/g Hb (Mittelwert 15 pmol/g Hb) [Bahner *et al.*, 2004].

In einer Studie zur Erfassung der ernährungs- und tabakrauchbedingten Belastung mit Acrylamid wurden Blutproben von 395 Probanden aus der Allgemeinbevölkerung hinsichtlich ihrer Gehalte an AAVal-Addukten untersucht. Anhand eines Fragebogens wurden neben demographischen Daten individuelle Ernährungsgewohnheiten, mit Schwerpunkt auf acrylamidhaltigen Lebensmitteln, sowie das Rauchverhalten erfasst. Für die 296 teilnehmenden Nichtraucher wurde ein Acrylamidaddukt-Konzentration von $0,4 \pm 0,2 \mu\text{g/L}$ Blut (entspricht ca. $16 \pm 8 \text{ pmol AAVal/g Hb}$) ermittelt. Die 99 Raucher wiesen demgegenüber einen signifikant höheren mittleren Adduktspiegel von $1,5 \pm 1,4 \mu\text{g/L}$ Blut (entspricht ca. $60 \pm 56 \text{ pmol AAVal/g Hb}$) auf. Es wurde zusätzlich auch das tabakrauchspezifische Acrylnitril-Hämoglobinaddukt (N-Cyanoethylvalin) miterfasst. Die im Rahmen dieser Studie erhobenen Eigenangaben zum Rauchverhalten wurden bis auf wenige Ausnahmen durch die Ergebnisse der Adduktmessungen bestätigt. Das Passivrauchen beeinflusste die Adduktkonzentration nicht messbar. Jedoch brachte weder die Betrachtung der Verzehrshäufigkeit der einzelnen Nahrungsmittel noch die Aufsummierung der gewichteten Häufigkeiten einen statistisch signifikanten Zusammenhang zum Adduktspiegel. Dies kann durch die vergleichsweise ungenaue Erfassung der Ernährungsgewohnheiten durch einen Fragebogen und die Variabilität der Acrylamidgehalte der Lebensmittel bedingt sein. Tendenziell zeigte sich bei Personen, die mehrmals pro Woche Pommes Frites und Kartoffelchips zu sich nahmen, gegenüber den übrigen Probanden leicht erhöhte Acrylamidbelastungen [Bader, 2005].

Um Informationen über die Exposition der normalen Bevölkerung mit Acrylamid zu erhalten, ist die Untersuchung zahlreicher Blutproben notwendig. Vesper *et al.* entwickelten daher eine automatisierte und optimierte Form der Probenaufarbeitung,

die eine hohe Durchsatzkapazität für Proben erlaubt. Als interne Standards wurden alkylierte Oktapeptidstandards verwendet. Es wurde anhand der Proben von 96 Personen die Vergleichbarkeit der konventionellen Edman-Methodik mit der neuen Methodik getestet. Die Acrylamid-Hämoglobinadduktgehalte wiesen Werte zwischen 27-453 pmol/g Hb (Median 129 pmol/g Hb) auf, während die Glycidamid-Hämoglobinadduktgehalte zwischen 27-240 pmol/g Hb (Median 97 pmol/g Hb) betrugen. Das Median GAVal/AAVal-Verhältnis lag bei 0,87 und variierte zwischen 0,33-3,12. Es wurden keine signifikanten Unterschiede bei den Adduktgehalten von männlichen und weiblichen Probanden gefunden. Das GAVal/AAVal-Verhältnis ist jedoch in Frauen signifikant höher als in Männern. Ferner nimmt das GAVal/AAVal-Verhältnis mit abnehmenden Acrylamidkonzentrationen ab, was auf eine Sättigung des Metabolismus durch CYP 2E1 hindeutet [Vesper *et al.*, 2006].

Scherer *et al.* untersuchten die Beziehung zwischen Biomarkern der Exposition von Tabakrauch-Inhaltsstoffen darunter auch Acrylamid in Rauchern und den Nikotin- oder Teergehalten gemäß der ISO-Standard-Rauchmaschine. An der Studie waren insgesamt 366 Probanden beteiligt, davon 266 Raucher und 100 Nichtraucher. Die durchschnittlichen Gehalte an AAVal betrugen $84,1 \pm 41,8$ pmol/g Hb bei den Rauchern und $27,8 \pm 7,1$ pmol/g Hb bei den Nichtrauchern. Für die Raucher zeigten alle Biomarker einen signifikanten Anstieg mit dem täglichen Zigarettenkonsum, jedoch lag der Korrelationskoeffizient für AAVal nur bei $r = 0,48$ [Scherer *et al.*, 2007].

Wilson *et al.* bestimmten die AAVal- und GAVal-Gehalte von 296 weiblichen Teilnehmern einer Kohortenstudie, um die Korrelation mit der auf einem Fragebogen basierenden Schätzung der Acrylamidaufnahme zu überprüfen. Dabei wurden Mediangehalte von 43,9 pmol/g Hb für AAVal und von 49,4 pmol/g Hb für GAVal sowie ein daraus resultierendes GAVal/AAVal-Verhältnis von 1,10 erhalten. Die Korrelation (95 %-Konfidenzintervall) der Biomarker zu den geschätzten Acrylamidaufnahmen war moderat, mit 0,19 für AAVal und 0,24 für GAVal [Wilson *et al.*, 2008].

Hartmann *et al.* bestimmten die AAVal- und GAVal-Gehalte in 91 Probanden im Alter zwischen 6 und 80 Jahren. Die Medianwerte für AAVal- und GAVal betrugen 30 (15-71) und 34 (14-66) pmol/g Hb sowie 1,1 für das GAVal/AAVal-Verhältnis (0,4-2,7). In der Gruppe der 6-10-Jährigen sowie in der Gruppe der 11-18-Jährigen wurden mit 38 pmol/g Hb bzw. 34 pmol/g Hb höhere Mediangehalte an AAVal bestimmt als in der Gruppe der 21-80-Jährigen mit 29 pmol/g Hb [Hartmann *et al.*, 2008b].

In einer Subgruppe der EPIC-Studie, einer länderübergreifenden Kohortenstudie, wurden in 510 Probanden aus 9 europäischen Ländern (50% Nichtraucher, 50%

Raucher) die Gehalte an AAlVal (14,5 - 623 pmol/g Hb) und GAlVal (7,8 - 377 pmol/g Hb) bestimmt. Das GAlVal/AAlVal-Verhältnis variierte zwischen 0,18 - 1,67. In den Nichtrauchern wurden mittlere AAlVal-Gehalte von 48,4 pmol/g Hb und GAlVal-Gehalte von 43,3 pmol/g Hb gefunden, in den Rauchern betrugen die entsprechenden Gehalte 137 bzw. 101 pmol/g Hb. Während in Großbritannien mit 64,8 pmol/g Hb für AAlVal und 58,4 pmol/g Hb für GAlVal besonders hohe Gehalte gefunden wurden, zeigte Schweden mit 35,4 pmol/g Hb für AAlVal und Dänemark mit 26,6 pmol/g Hb die niedrigsten Biomarkergehalte im Ländervergleich. In der Studie wurde gezeigt, dass Landeszugehörigkeit (AAlVal, GAlVal, $p < 0,0001$; GAlVal/AAlVal-Verhältnis, $p < 0,03$), Alkoholkonsum (GAlVal, invers, $p < 0,0001$; GAlVal/AAlVal-Verhältnis, invers, $p < 0,0001$), BMI (AAlVal, invers, $p < 0,003$), Geschlecht (GAlVal/AAlVal-Verhältnis, niedriger in Männern, $p < 0,0001$), Raucherstatus (AAlVal, GAlVal, $p < 0,0001$; GAlVal/AAlVal-Verhältnis, invers, $p < 0,0001$) und Bildungsgrad (AAlVal, GAlVal, invers) mit dem Gehalt der Biomarker bzw. dem GAlVal/AAlVal-Verhältnis assoziiert sind [Vesper *et al.*, 2008].

3.3.6.3 Humane Verzehrsstudien mit Acrylamid

Um den direkten Einfluss einer größeren aufgenommenen Menge Acrylamid auf die Biomarker AAlVal und GAlVal zu untersuchen, wurden mehrere humane Verzehrsstudien durchgeführt.

Die Acrylamid-Verzehrsstudie von Fennell *et al.* wurde durchgeführt, um das Ausmaß der Umwandlung von Acrylamid zu Glycidamid in Abhängigkeit von dermalen oder oraler Applikation zu untersuchen. Dabei wurden neben den Hämoglobinaddukten auch die Mercaptursäuren von Acrylamid und Glycidamid bestimmt. 24 männliche Probanden nahmen oral Dosen von 0,5, 1,0 oder 3,0 mg/kg KG $1,2,3\text{-}^{13}\text{C}_3$ -Acrylamid gelöst in 200 mL Wasser zu sich. In der dermalen Phase wurde eine 50 %ige wässrige Lösung von $^{13}\text{C}_3$ -Acrylamid (3 mg/kg KG) an 5 aufeinander folgenden Tagen direkt auf die Haut der Unterarme (24 cm^2) aufgetragen, mit einem Haartrockner getrocknet und die Haut anschließend mit Gaze bedeckt. Die aus den nach 24 h erfolgten Waschungen berechnete mittlere dermal aufgenommene Menge Acrylamid variierte zwischen 0,73 und 0,86 mg/kg KG/Tag, während die kumulativ aufgenommene Dosis $2,35 \pm 0,50$ mg/kg KG betrug. Die Isotopenmarkierung des Acrylamids ermöglichte eine Unterscheidung zwischen dem Hintergrundaddukt-Gehalt und der Menge des auf Grund der Acrylamidgabe neu gebildeten Adduktes. Vor Acrylamidgabe variierte der Acrylamid-Adduktgehalt zwischen 40-200 pmol/g Hb

(79 ± 49 pmol AAVal/g Hb) und der Glycidamid-Adduktgehalt zwischen 16-67 pmol/g Hb. Nach Gabe des $^{13}\text{C}_3$ -Acrylamids zeigten jeweils 5 der 6 Probanden aus jeder Gruppe eine Erhöhung des $^{13}\text{C}_3$ -AAVal- und $^{13}\text{C}_3$ -GAVal-Adduktgehaltes. Bei oraler Applikation stiegen sowohl die Level von $^{13}\text{C}_3$ -AAVal als auch von $^{13}\text{C}_3$ -GAVal in dosisabhängiger Weise an. Bei oraler Gabe von 0,5 mg/kg KG $^{13}\text{C}_3$ -Acrylamid entstanden 514 ± 49 pmol $^{13}\text{C}_3$ -AAVal/g Hb und 186 ± 47 pmol $^{13}\text{C}_3$ -GAVal/g Hb, bei Gabe von 1 mg/kg KG $^{13}\text{C}_3$ -Acrylamid entstanden 914 ± 125 pmol $^{13}\text{C}_3$ -AAVal/g Hb und 344 ± 52 pmol $^{13}\text{C}_3$ -GAVal/g Hb und bei Gabe von 3 mg/kg KG $^{13}\text{C}_3$ -Acrylamid entstanden 2479 ± 685 pmol $^{13}\text{C}_3$ -AAVal/g Hb und 1076 ± 237 pmol $^{13}\text{C}_3$ -GAVal/g Hb. Die Gehalte von $^{13}\text{C}_3$ -GAVal stiegen in vergleichsweise geringerem Maße an, so dass ein $^{13}\text{C}_3$ -GAVal/ $^{13}\text{C}_3$ -AAVal-Verhältnis von 0,36-0,44 resultierte. Bei dermalen Applikation wurden nach 5 Tagen Adduktgehalte von 464 ± 62 pmol $^{13}\text{C}_3$ -AAVal/g Hb und 316 ± 67 pmol $^{13}\text{C}_3$ -GAVal/g Hb gefunden. Das Verhältnis von $^{13}\text{C}_3$ -GAVal/ $^{13}\text{C}_3$ -AAVal variierte an den verschiedenen Tagen im Bereich von 0,48-0,68. Die dermale Applikation führte somit zu geringeren Adduktleveln im Vergleich zu der oralen Applikation [Fennell *et al.*, 2005].

In der Acrylamid-Verzehrsstudie von Vesper *et al.* nahmen 6 nicht-rauchende Probanden für eine Dauer von 7 Tagen eine tägliche Portion von ca. 85 g Kartoffelchips zu sich. Diese Menge Kartoffelchips entspricht einer Acrylamid-Exposition von 115 µg Acrylamid/Person/Tag bzw. 1,9 µg/kg KG/Tag. Die Adduktgehalte der Probanden entsprachen zu Beginn der Studie 34-46 pmol/g Hb (Mittelwert 39 pmol/g Hb, in der Studie jedoch mit 43 pmol/g Hb angegeben) für AAVal und 17-31 pmol/g Hb (Mittelwert 26 pmol/g Hb) für GAVal. Nach vollständigem Verzehr von insgesamt ca. 595 g Kartoffelchips nach einer Woche betrugen die Adduktgehalte 33-50 pmol/g Hb (Mittelwert 45 pmol/g Hb) für AAVal und 21-43 pmol/g Hb (Mittelwert 32 pmol/g Hb) für GAVal. Nach Angabe der Autoren wies nur ein Proband eine Erhöhung des Acrylamid-Adduktgehaltes auf, während sich bei 4 Probanden eine Erhöhung des Glycidamid-Adduktgehaltes zeigte. Unter Verwendung der in der Publikation angegebenen Daten zeigt sich jedoch, dass AAVal bei 5 Probanden eine durchschnittliche Erhöhung von 7 pmol/g Hb (+ 18 %) aufwies, während GAVal tatsächlich bei 4 Probanden einen Zuwachs von durchschnittlich 6 pmol/g Hb (+ 26 %) erzielte. Die maximal bei einem einzelnen Probanden beobachtete Erhöhung des Acrylamid-Adduktgehalts betrug 46 %, während der Glycidamid-Adduktgehalt einen maximalen prozentualen Zuwachs von 79 % zeigte. Das ebenfalls aus den Daten der Publikation errechnete durchschnittliche GAVal/AAVal-Verhältnis betrug sowohl zu Beginn der Studie als

auch nach erfolgter Acrylamidaufnahme 0,7 und zeigte somit keine Veränderung [Vesper *et al.*, 2005].

Tabelle 5: Humane Studien zur Bestimmung der Hämoglobinaddukte von Acrylamid und Glycidamid; NR: Nichtraucher; R: Raucher; n.d.: nicht detektiert; n.b.: nicht bestimmt

Studie	Anzahl der Probanden	AA-Val [pmol/g Hb]	GA-Val [pmol/g Hb]
Bergmark et al. [1993]	5 NR, 5 R	< 10 bei 1 R	n.d.
Bergmark et al. [1997]	8 NR, 10 R	31 (NR); 116 (R)	n.b.
Perez et al. [1999]	2 NR, 2 R	41 (NR); 81 (R)	3 (NR); 7 (R)
Hagmar et al. [2001]	18 NR	20-70 (NR)	n.b.
Schettgen et al. [2002]	8 NR, 2 R	28 (NR+R); Median	n.b.
Paulsson et al. [2003]	5 NR	27 ± 6 (NR)	26 ± 6 (NR)
Schettgen et al. [2004b]	13 NR, 16 R	19 ± 7 (NR); 80 ± 48 (R)	17 ± 7 (NR); 53 ± 30 (R)
Schettgen et al. [2004a]	10 NR, 1 R	21 (NR+R)	n.b.
Bahner et al. [2004]	10 NR	15 (NR)	n.b.
Bader et al. [2005]	296 NR, 99 R	12 ± 6 (NR); 50 ± 45 (R)	n.b.
Vesper et al. [2006]	96	129; Median	97; Median
Scherer et al. [2007]	100 NR, 166 R	27,8 ± 7,1 (NR); 84,1 ± 41,8 (R)	n.b.
Wilson et al. [2008]	296 NR	43,9 (NR); Median	49,4 (NR); Median
Hartmann et al. [2008]	91 NR	30; Median	34; Median
Vesper et al. [2008]	255 NR, 255 R	48,4 (NR), 137 (R)	43,3 (NR), 101 (R)
Fennell et al. [2005]	24 NR	79 ± 49 (NR)	16-67 (NR)
Vesper et al. [2005]	6 NR	43 ± 8 (NR)	26 ± 5 (NR)

3.4 Prinzip der verwendeten Methoden

3.4.1 Modifizierter Edman-Abbau

Der sogenannte Edman-Abbau zur Untersuchung der Primärstruktur eines Proteins wurde von Pehr Edman Mitte des letzten Jahrhunderts entwickelt. Die zyklische Reaktionsabfolge, bei der vom N-Terminus eines Polypeptids schrittweise Aminosäuren abgespalten und identifiziert werden, umfasst die drei Reaktionsschritte Kupplung, Spaltung und Konvertierung. Zunächst reagiert PITC (Phenylisothiocyanat) unter alkalischen Bedingungen mit der α -Aminogruppe der N-terminalen Aminosäure. Die Abspaltung erfolgt im sauren Milieu durch einen Angriff des Schwefelatoms von Phenylisothiocyanat auf die Carbonylgruppe der ersten Peptidbindung als zyklisches ATZ-Derivat (Anilinothiazolinon), das in einer Konvertierungsreaktion in eine stabile PTH-Aminosäure (Phenylthiohydantoin) umgewandelt wird. Aufgrund der unvollständigen Reaktionsausbeute pro Einzelzyklus (95-98%) ergibt sich eine praktisch erreichbare Obergrenze von 20-40 Zyklen für ein Polypeptid [Edman, 1950, Edman, 1960, Müller-Esterl, 2004].

Eine Weiterentwicklung des oben beschriebenen, klassischen Edman-Abbaus stellt der modifizierte Edman-Abbau, auch N-Alkyl-Edman-Abbau genannt, dar. Beim modifizierten Edman-Abbau wird die N-alkylierte, N-terminale Aminosäure effizienter als unsubstituierte N-terminale Aminosäurereste abgespalten. So können mit Hilfe dieser Methodik die Addukte am N-terminalen Valin des Hämoglobin als Monitormolekül spezifisch erfasst werden. Durch die Einbindung massenspektrometrischer Techniken ist die Identifizierung und Quantifizierung von Hintergrundbelastungen elektrophiler Substanzen wie Epoxiden, Alkenen, methylierenden Agenzien und Aldehyden *in vivo* möglich. Die Methodik wurde Ende der 70er Jahre des vergangenen Jahrhunderts entwickelt. Mowrer et al. verwendeten den modifizierten Edman-Abbau für die N-terminalen Hämoglobinaddukte von Ethylenoxid, Propylenoxid und Styroloxid [Mowrer *et al.*, 1986]. Für den modifizierten Edman-Abbau wird häufig Pentafluorphenylisothiocyanat (PFPITC) als Derivatisierungsreagenz verwendet, da diese Substanz Derivate generiert, die ausreichend unpolar für eine Extraktion mit organischen Lösungsmitteln sowie ausreichend flüchtig für eine gaschromatographische Methodik sind. Die Umsetzung zum Pentafluorphenylthiohydantoin (PFPTH) konnte innerhalb kurzer Zeit als vollständig nachgewiesen werden. Die Verwendung des fluorierten Edman-Reagenzes in Kombination mit der Anwendung der negativen chemischen Ionisation

bei der massenspektrometrischen Quantifizierung der Derivate ermöglicht die hohe Sensitivität der Methodik. Das zur massenspektrometrischen Bestimmung verwendete Fragment ist in diesem Fall $[M-20]^-$ m/z, das durch Abspaltung von Fluorwasserstoff generiert wird. Jedoch ist nicht das Derivatisierungsreagenz oder die Struktur der beteiligten Aminosäuren für den vom klassischen Edman-Abbau abweichenden Reaktionsmechanismus von Bedeutung, sondern das Vorhandensein des N-Substituenten, wobei die Art des Substituenten keine Rolle spielt. Die Erhöhung der Zyklisierungs- und Abspaltungsrate von N-substituierten Valinen im Vergleich zu unsubstituierten Valinen ist auf den geminalen Dialkyleffekt zurückzuführen. Die Zyklisierung verläuft einstufig durch einen direkten Angriff des Thiocarbamoyl-Stickstoffs auf das C-1-Atom des Valins. Die Verwendung von Formamid als protisches Lösungsmittel beruht auf einer Verringerung der Bildung von Nebenprodukten sowie den guten Lösungseigenschaften für Globin. Ein hoher pH-Wert sowie die Gegenwart von Sauerstoff über einen längeren Zeitraum führt zu einer Degeneration der Edman-Derivate [Lequin und Niall, 1972, Rydberg *et al.*, 2002, Rydberg *et al.*, 1993].

Neueste Entwicklungen erlauben eine Automatisierung des modifizierten Edman-Abbaus und ermöglichen damit die Aufarbeitung größerer Probenzahlen. Vesper *et al.* optimierten im Rahmen dieser Entwicklungsarbeit auch die Bedingungen der Methodik hinsichtlich pH-Wert, Temperatur und Extraktionstechnik. Maximale Ausbeuten wurden bei pH 6-7, Erhitzen des Reaktionsgemisches auf 55°C für zwei Stunden erzielt. Ferner wurde die Möglichkeit einer Flüssig-Flüssig-Extraktion an Diatomeenerde erfolgreich getestet [Vesper *et al.*, 2006].

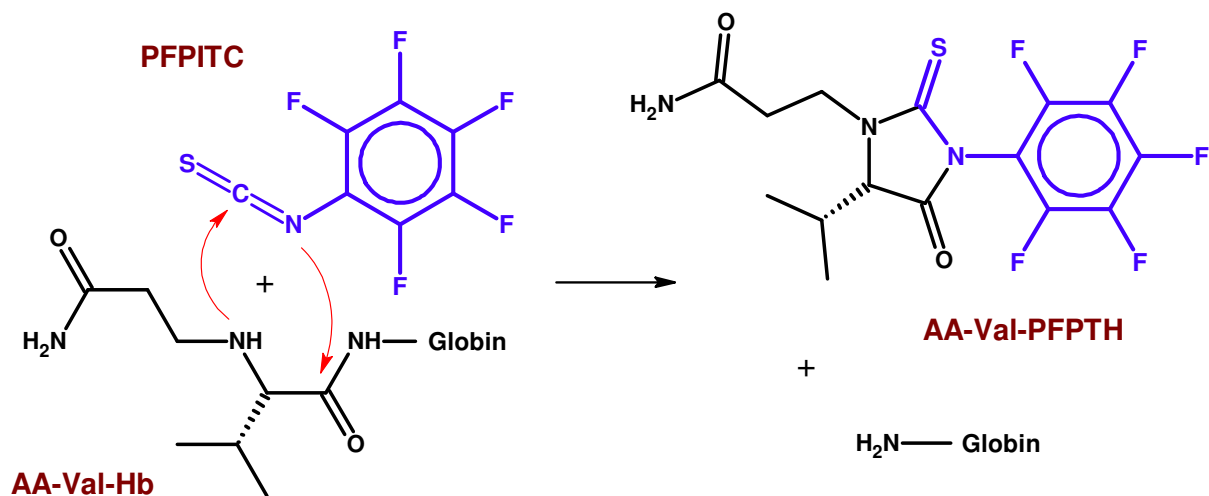


Abbildung 12: Mechanismus des modifizierten Edman-Abbaus am Beispiel des N-terminalen Hämoglobinadduktes von Acrylamid [Rydberg *et al.*, 2002]

3.4.2 Prinzip des Flüssig-Szintillationszählers (LSC)

Ein Flüssig-Szintillationszähler besteht aus einem Szintillator, einem Sekundärelektronenvervielfacher (Photomultiplier) und einem Pulshöhenanalysator. Die im Falle von Flüssig-Szintillationszählern verwendeten Szintillatoren sind ungesättigte und aromatische organische Substanzen. Das Messprinzip beruht darauf, dass die auf den Szintillator einfallende Strahlung ein Valenzelektron anregt, das bei der Rückkehr in den Grundzustand Photonen aussendet, welche im Sekundärelektronenvervielfacher auf die erste Photokathode auftreffen und die Emission weiterer Elektronen verursachen. Mit Hilfe des Sekundärelektronenvervielfachers wird die Zahl der Elektronen um ein Vielfaches erhöht und der Stromimpuls, der an der Anode entsteht, weiter verstärkt. [Bethge *et al.*, 2001]

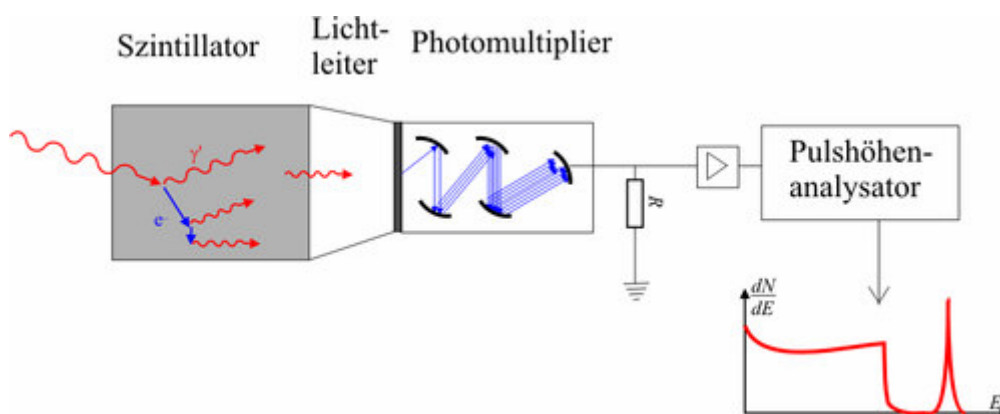


Abbildung 13: Messprinzip des Flüssigszintillationszählers [Wikipedia]

3.4.3 Prinzip der Massenspektrometrie (MS)

Die Massenspektrometrie ist ein Verfahren zur Trennung von im Vakuum stabilen Molekülen nach ihrem Verhältnis von Masse zu Ladung (m/z). Zentrale Bedeutung hat die Massenspektrometrie bei der Identifizierung komplexer Stoffgemische, der Strukturaufklärung und der Quantifizierung von Spuren- und Ultraspuren. Organische Verbindungen lassen sich im Bereich von 10^{-12} bis 10^{-17} mol noch quantitativ erfassen. Die massenspektrometrische Analyse erfolgt in der Regel unter Molekülfragmentierung bzw. Atomisierung und Ionisierung der in das Vakuum des Massenspektrometers eingebrachten Probe. Organische Moleküle zeigen ein bestimmtes, von der Ionisierungsmethode abhängiges Fragmentierungsverhalten.

Die Ionisationsausbeute ist bestimmend für die Nachweisempfindlichkeit des Massenspektrometers. Die Elektronenstoßionisation (EI) arbeitet mit einem Strahl thermischer Elektronen mit meistens 70 eV, der senkrecht auf den durch Verdampfen erzeugten Molekülstrahl geschossen wird. Dabei entstehen hauptsächlich Radikalkationen $M^{+\bullet}$, die durch ein angelegtes elektrisches Feld in die gewünschte Richtung beschleunigt und mittels Ionenoptik auf den Eintrittsspalt des Massenseparationssystems fokussiert werden. EI zählt zu den harten Ionisierungstechniken, d.h. es werden Energien im Überschuss an die primär gebildeten Molekülionen abgegeben, die unter Fragmentierung relaxieren. Es resultieren relativ komplexe Massenspektren mit zahlreichen Fragmentationen und häufig wenig Mutterionen. Die Chemische Ionisation (CI) gehört ebenfalls zu den am häufigsten angewendeten Ionisierungstechniken und stellt eine weiche Ionisierungsmethode dar. Aus dem Reaktandgas werden durch Elektronenstoßionisation mit ca. 150 eV relativ energiereiche Primärionen gebildet, die dann über Stöße in der Gasphase die Analytmoleküle ionisieren. Bei der Positiv-Ionen CI finden häufig Wasser, Methan, Isobutan oder Ammoniak Anwendung. Die Reaktandionen sind Brönstedt-Säuren und ionisieren die Analytmoleküle i.d.R. durch Protonierung. Durch die Auswahl des Reaktandgases mit einer bestimmten Protonenaffinität kann das Ausmaß der Fragmentierung gesteuert werden. Die große analytische Bedeutung hat die Negativ-Ionen CI über die Elektronenanlagerung erlangt. In der CI-Quelle bildet sich aus den ursprünglich eingestrahlten Elektronen (150 eV) durch Stöße mit dem Reaktandgas eine Wolke thermischer Ionen, deren Energie im Bereich von nur einigen eV liegt und die mit hoher Effizienz von einem unbesetzten Orbital eines Analytmoleküls eingefangen werden können. Durch eine Derivatisierung der Analytmoleküle mit einem Reagenz, das eine Gruppierung mit hoher Elektronenaffinität enthält, kann die Effektivität des Elektroneneinfangprozesses gesteigert werden.

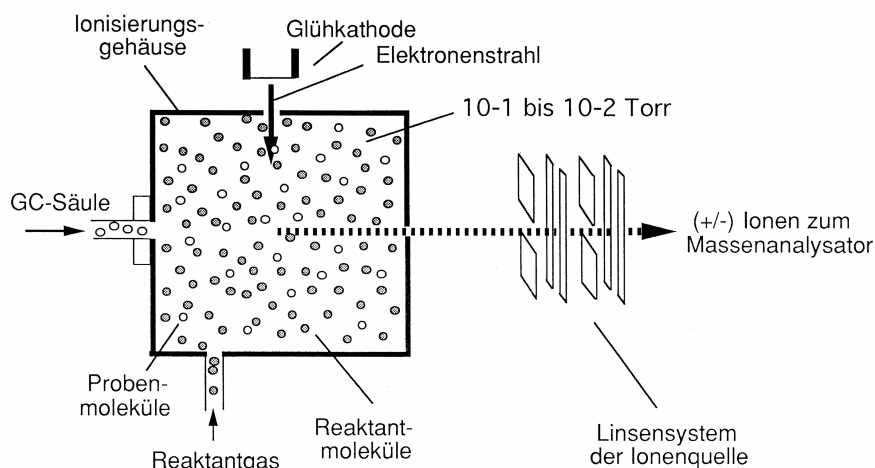


Abbildung 14: Schematischer Aufbau einer CI-Ionenquelle [Lehmann, 1996]

Die resultierenden Massenspektren zeichnen sich im Vergleich zu EI durch eine relative Signalarmut aus, da fast immer das intakte Molekül neben einigen wenigen Fragmentionen vorhanden ist. [Cammann, 2001, Lehmann, 1996]

Die Auftrennung der Analyten nach ihrem m/z -Verhältnis findet in einem Hochvakuum (10^{-1} bis 10^{-5} Pa) statt, so dass Streuung und Stöße der Ionen an Luft- oder Gasteilchen vermieden werden und so eine bleibende Ionisierung und ungestörte, fokussierbare Ionenstrahlen ermöglicht werden. Die Geschwindigkeit der Ionen ergibt sich aus der kinetischen Energie, die sie durch Ionisation und anschließende Beschleunigung im angelegten elektrischen Feld aufnehmen. Die Massenauftrennung kann nach verschiedenen Prinzipien erfolgen: Magnetfeld- und Sektorfeld-Trennung, Quadrupolmassenfilter, Ionenfalle, Umlauffrequenzbestimmung der Ionen in einer Ionencyclotronresonanz-Zelle, Bestimmung der Flugzeit (TOF). Die jeweils angewandte Separationstechnik ist entscheidend für den Massenbereich des Spektrometers (5 Da bis 1,5 MDa), die Massenauflösung und die Nachweisempfindlichkeit. Am weitesten verbreitet sind Quadrupol-Massenfilter, die aus vier konzentrisch parallel zueinander angeordneten Stabelektroden aufgebaut sind, die gegenüberliegend paarweise an eine variable jeweils entgegengesetzt gepolte Gleichspannungsquelle angeschlossen sind. Zusätzlich wird eine variable Hochspannungsfrequenz überlagert, so dass nur Ionen gleicher Masse auf bestimmten stabilen Wellenbahnen nach dem Passieren des Quadrupols den Massendetektor erreichen. Vorteile des Quadrupol-Massenfilters sind die hohe dynamische Empfindlichkeit für den Ionenstrom von bis zu sieben Größenordnungen

und die Möglichkeit bei relativ hohen Drücken arbeiten zu können. Typische Massenauflösungen (Δm) für Quadrupol-Massenfilter sind 0,01 bis 0,1 amu.

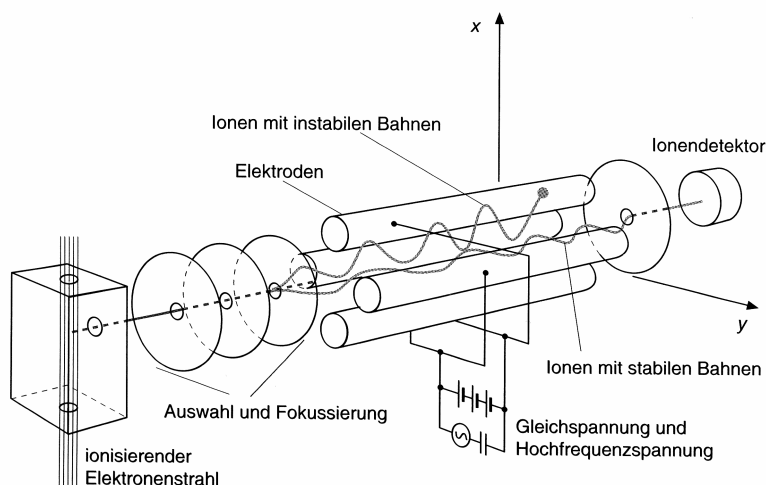


Abbildung 15: Schema eines Quadrupolmassenfilters mit stabilen und instabilen Ionenbahnen [Cammann, 2001]

Der Detektor wandelt den aufgetrennten Ionenstrom in ein elektrisch messbares Signal um.

Mit Hilfe der Isotopenverdünnungsanalyse lassen sich die Präzision und Richtigkeit der analytischen Bestimmung optimieren, da sich die zugesetzten Analyt-Isotopen ebenso wie die Analyte selbst verhalten und auf diese Weise Verluste oder unterschiedliche Extraktions- oder Ionisierungsausbeuten kompensieren. [Cammann, 2001, Lehmann, 1996]

3.4.4 Prinzip der Kopplung von HPLC und MS

Die direkte Kopplung (on-line-Kopplung) zwischen Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie wurde erst dann routinetauglich, als das Problem der Entfernung des Elutionsmittels technisch gelöst werden konnte. Zur Behebung dieser Problematik wurden verschiedene sog. Interfaces entwickelt. Von großer Bedeutung sind vor allem das Elektrospray-Verfahren (ESI) und das Verfahren der chemischen Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI). Beides sind API-Verfahren, d.h. die Ionisierungsvorgänge finden bei Atmosphärendruck statt. Wachsende Bedeutung erlangten die API-Interfaces in den späten 1980er Jahren, in den frühen 1990er Jahren folgten erste Anwendungen in der Toxikologie.

Beim ESI-Verfahren wird das HPLC-Eluat (übliche Flussraten 200 $\mu\text{l}/\text{min}$) durch eine Kapillare, an der eine Hochspannung von ungefähr 3 kV angelegt ist, in das Interface eingebracht. Unterstützt durch Stickstoff als sog. Vernebelungsgas werden am Kapillarende kleine, hochgeladene Tröpfchen gebildet, die im Gasstrom weggetragen und desolvatisiert werden. Dadurch bedingt steigt das Ladungs-Volumenverhältnis der Tröpfchen stark an, bis nach Überschreiten eines kritischen Wertes durch „Coulomb-Explosionen“ eine weitere Verkleinerung der Tröpfchen stattfindet. Unterstützt werden kann dieser Prozess durch einen zusätzlichen, orthogonal positionierten aufgeheizten Stickstoffstrom. Anschließend werden die Teilchen durch einen beheizten Transferbereich ins Vakuum überführt. Das ESI-Verfahren eignet sich besonders für moderat unpolare bis hochpolare Substanzen, die leicht protoniert (positiver Modus) oder leicht deprotoniert (negativer Modus) werden. Auch große und empfindliche Moleküle werden nur in geringem Ausmaß fragmentiert. Problematisch ist hingegen die Ionisation von unpolaren Substanzen.

Beim APCI-Verfahren (heated-nebulizer) wird das HPLC-Eluat durch eine stark beheizte Kapillare geführt und unter Mithilfe von Stickstoff als Nebulizergas verdampft. Durch eine Coronar-Entladung an einer Nadel werden Lösungsmittelbestandteile protoniert (positiver Modus) oder deprotoniert (negativer Modus). Dann erfolgt die eigentliche chemische Ionisation der Analytmoleküle durch Ladungsübertragung. Das APCI-Verfahren ist ebenfalls eine weiche Ionisierungstechnik, da eine geringe Fragmentierung der Analyten auftritt. Jedoch besteht eine relative Inkompatibilität mit thermisch labilen Analyten. Die Ionisation von unpolaren Substanzen ist mit APCI gut möglich, so dass sich eine teilweise Überlappung mit dem Anwendungsbereich der GC/MS ergibt.

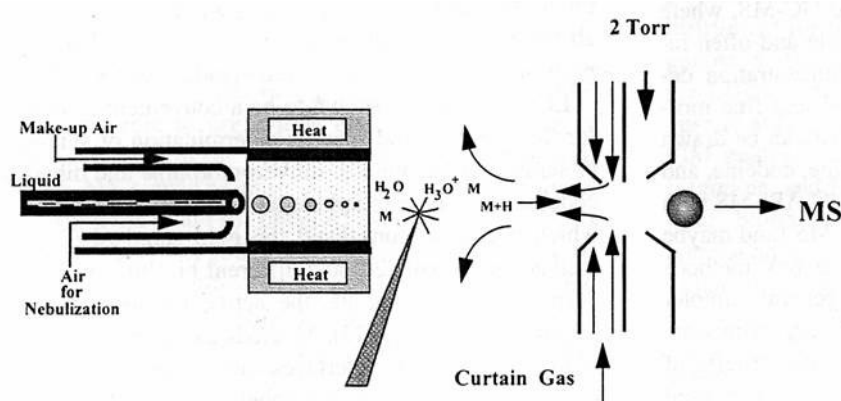


Abbildung 16: APCI-Ionenquelle [Marquet, 2002]

Die Verwendungsmöglichkeiten sind neben den Interfaces im Besonderen von der Art des Massenanalysators abhängig. Weit verbreitet sind Single Quadrupol-

Analysatoren, deren Einsatz für Strukturaufklärung und Quantifizierung nur eingeschränkt möglich ist. Triple Quadrupol-Analysatoren (LC/MS/MS) besitzen vier in Reihe geschaltete Quadrupole. Während Q_0 lediglich zur Fokussierung des Massenstroms dient, stellen Q_1 und Q_3 Massenselektoren dar. Als Fragmentierungskammer wird Q_2 verwendet, der mit einem Kollisionsgas, meist Stickstoff, gefüllt ist. Je nach Einstellung der Massenselektoren sind Produktionenscans (Q_1 : konst. Masse, Q_3 : Massenbereich) und Elternionenscans (Q_1 : Massenbereich, Q_3 : konst. Masse) möglich. Für Quantifizierungen besonders geeignet ist der MRM-Modus (multiple reaction monitoring), bei dem im Q_1 Elternionen selektiert werden. Nach erfolgter Fragmentierung in Q_2 werden in Q_3 ausschließlich die bekannten substanzspezifischen Fragmentionen detektiert. Der wesentliche Vorteil dieser Betriebsart ist die Ausblendung von Störsignalen komplexer Matrices, wie sie in biologischen Proben häufig zugegen sind. Das Signal-zu-Rausch-Verhältnis wird deutlich verbessert.

Bei der Verwendung von Ionenfallen ist sogar eine Mehrfachfragmentierung von bis zu MS^{10} möglich. Den Möglichkeiten einer komplexen Strukturaufklärung steht eine im Vergleich zum Quadrupol-Analysator geringere Reproduzierbarkeit gegenüber. [Cammann, 2001, Marquet, 2002]

3.4.5 Prinzip der Kopplung von GC und MS

Bei der direkten Kopplung (on-line-Kopplung) zwischen Gaschromatographie und Massenspektrometrie wird die GC-Säule (i.d.R. Dünnschichtkapillarsäulen) über ein heizbares Interface an die Ionenquelle des Massenspektrometers angeschlossen. Die Trägergasströme sind für die MS gut kompatibel. Weit verbreitet sind vor allem Quadrupol und Ionenfallen-Geräte. Bei dieser Kopplungstechnik werden die Vorteile der hohen Trennleistung des Gaschromatographen mit der hohen Selektivität und Sensitivität der Massenspektrometrie kombiniert. Diese Art der Kopplung ist technisch deutlich einfacher zu realisieren als HPLC/MS. Die Grenzen der GC/MS liegen dort, wo reale Proben nichtflüchtige Matrixbestandteile enthalten. Wie bei der GC sind deshalb Aufreinigungs- und Derivatisierungstechniken nötig. Als Ionisierungstechniken sind EI und CI möglich. Die Ionisierung durch Elektronenstoß (EI) stellt bei allen GC/MS-Geräten das Standardverfahren dar. Die mit dieser harten Ionisierungstechnik erzeugten Fragmentierungsmuster eignen sich besonders zur Identifizierung von Substanzen unter Verwendung von Spektrenbibliotheken. Durch

chemische Ionisation (CI) erzeugte Spektren hingegen weisen deutlich weniger Fragmente auf und liefern damit wichtige Informationen über das Molekül selbst. Bei der Datenaufnahme wird zwischen der Detektion vollständiger Spektren (Scan) und der Einzelmassenregistrierung (SIM, selected ion monitoring) unterschieden. Wie auch bei der LC/MS-Kopplung spielen mehrstufige Massenspektrometer (GC/MS/MS) eine größer werdende Rolle. [Cammann, 2001, Hübschmann, 1996]

4 Material und Methoden

4.1 *Synthese der Pentafluorphenylthiohydantoin-Derivate zur Standardisierung*

4.1.1 Geräte, Chemikalien und Materialien

Geräte

Kühlschrank	Comfort *** [Liebherr]
Labor-Glasgeräte	diverse Duranglas
Magnetrührer mit Heizplatte	MR 3001 K [Heidolph]
NMR-Messröhrchen	
NMR-Spektroskop	Bruker DPX 400
Ölpumpe	RD 8 [Vacuubrand]
Gefriertrocknung	Alpha 1050 [Christ]

Chemikalien

Aceton	p.a. [J.T. Baker]
Acrylamid	p.a. [Merck]
Ethanol	technisch
Ethylacetat	technisch
Glycidamid	synthetisiert von P.Mertes, AK
	Eisenbrand
n-Hexan	95% [J.T. Baker]
Pentafluorphenylisothiocyanat (PFPITC)	purum ≥ 97.0 % (GC) [Fluka]
1-Propanol	p.a. [Merck]
Schwefelsäure	p.a. [J.T. Baker]
Toluol	für die Spektroskopie [Merck]
Triethylamin	purum ≥ 98.0 % (GC) [Fluka]
L-Valin	biochemische Zwecke [Merck]
L-d ₈ -Valin	98 atom % D [Isotec]
Wasser	bidestilliert

Verbrauchsmaterialien

Kieselgel	Partikelgröße 0.063-0.2 mm [Macherey und Nagel]
-----------	--

4.1.2 Synthese von AAVal-PFPTH (1-(2-Aminocarbonylethyl)-(S)-5-isopropyl-3-pentafluorophenyl-2-thiohydantoin)

Allgemeines

Die dünnschichtchromatographischen Untersuchungen wurden mit Kieselgelplatten der Firma Merck (Kieselgel 60 F₂₅₄) ausgeführt. Die Detektion erfolgte mit UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 254$ nm. Für säulenchromatographische Trennungen wurde Kieselgel 60 der Firma Macherey und Nagel verwendet (Partikelgröße 0,063-0,2 mm oder 0,040-0,063 mm). Elementaranalysen wurde im Fachbereich Chemie mit dem Elementaranalyser EA 240 der Firma Perkin-Elmer durchgeführt. Die Aufnahme der ¹H-(400.1 MHz)-NMR-Spektren erfolgte mit einem DPX 400 der Firma Bruker. Alle Spektren wurden, falls nicht anders angegeben, bei 298 K aufgenommen. Die Angabe der chemischen Verschiebung erfolgt in der δ -Skala in ppm.

4.1.2.1 Arbeitsvorschriften

Stufe 1: N-2-Aminocarbonylethyl-L-Valin (AAVal)

Zu einer Lösung von 1,76 g (15 mmol) L-Valin in 30 ml Wasser und 2,6 ml (1,90 g, 19 mmol) Triethylamin werden in einem 100 ml Rundkolben 10,0 g (141 mmol) Acrylamid gegeben. Der pH-Wert der Lösung beträgt etwa 10. Es wird 6 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Nach Überführen des Reaktionsansatzes in einen 500 ml Rundkolben werden 300 ml Aceton zur Fällung des Rohproduktes zugegeben. Das Rohprodukt wird mit einem Büchnertrichter abgenutscht und mit Aceton gewaschen. Es wird ein weißer Feststoff erhalten.

Stufe 2: N-2-Aminocarbonylethyl-L-valyl-pentafluorphenylthiohydantoin (AAVal-PFPTH)

In einem 250 ml Dreihalskolben mit Rückflusskühler und Innenthermometer werden 90 ml 0,5 M NaHCO₃-Lösung und 45 ml 1-Propanol mit 0,50 g (2,66 mmol) N-2-Aminocarbonylethyl-L-valin (AAVal) versetzt und unter Rühren im Wasserbad auf 45 °C erwärmt. Es werden 1,5 ml (2,39 g, 10,6 mmol) Pentafluorphenylisothiocyanat (PFPTC) hinzugefügt und 2 h rühren gelassen. Anschließend wird das Reaktionsgemisch im Eisbad abgekühlt.

Die wässrige Lösung wird viermal mit jeweils 100 ml n-Hexan extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt und das Lösungsmittel am

Rotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von 30°C entfernt. Das Rohprodukt wird 1½ h im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Der viskose Rückstand wird an einer Kieselgelsäule (60 x 5 cm; n-Hexan/Ethylacetat 1/7, v/v) chromatographisch gereinigt. Die Kontrolle der Trennung erfolgt mittels DC. Das gewünschte Thiohydantoin zeigt einen R_f -Wert von 0,2).

4.1.3 Synthese von AAd₇Val-PFPTH (1-(2-Aminocarbonylethyl)-(S)-5-d₇-isopropyl-3-pentafluorophenyl-2-thiohydantoin)

4.1.3.1 Arbeitsvorschriften

Stufe 1: N-2-Aminocarbonylethyl-L-d₈-Valin (AAd₈Val)

Zu einer Lösung von 0,44 g (3,5 mmol) L-d₈-Valin in 7,5 ml Wasser werden in einem 100 ml Rundkolben 0,65 ml (0,47 g, 4,7 mmol) Triethylamin und 2,5 g (35 mmol) Acrylamid gegeben. Der pH-Wert der Lösung beträgt etwa 10. Es wird 6 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Zur Fällung des Rohproduktes werden 40 ml Aceton zugegeben. Das Rohprodukt wird mit einem Büchnertrichter abgenutscht und mit Aceton gewaschen. Es wird ein weißer Feststoff erhalten.

Stufe 2 : N-2-Aminocarbonylethyl-L-valyl-pentafluorphenylthiohydantoin (AAd₇Val-PFPTH)

In einem 100 ml Dreihalskolben mit Rückflusskühler und Innenthermometer werden 18 ml 0,5 M NaHCO₃-Lösung und 9 ml 1-Propanol mit 0,10 g (0,53 mmol) N-2-Aminocarbonylethyl-L-d₈-valin (AAd₈Val) versetzt. Unter Rühren wird die Lösung im Wasserbad auf 45°C erwärmt. Es werden 0,3 ml (0,48 g, 2,1 mmol) PFPITC hinzugefügt und 2 h rühren gelassen. Anschließend wird das Reaktionsgemisch im Eisbad abgekühlt.

Die wässrige Lösung wird viermal mit jeweils 20 ml n-Hexan extrahiert. Die organischen Phasen werden vereinigt und das Lösungsmittel im Rotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von 30°C entfernt. Das Rohprodukt wird 1½ h im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Der viskose Rückstand wird an einer Kieselgelsäule (40 x 2,5 cm; n-Hexan/Ethylacetat 1/7, v/v) chromatographisch gereinigt. Die Kontrolle der Trennung erfolgt mittels DC. Das gewünschte Thiohydantoin zeigt einen R_f -Wert von 0,43.

4.1.4 Synthese von GAd₇Val-PFPTH (*N*-2-Aminocarbonyl-2-hydroxyethyl-L-d₇-valyl-pentafluorphenyl-thiohydantoin)

4.1.4.1 Arbeitsvorschrift

Stufe 1: *N*-2-Aminocarbonyl-2-hydroxyethyl-L-d₈-Valin (GAd₈Val)

Zu einer Lösung von 0,25 g (2,0 mmol) L-d₈-Valin in 4,2 ml Wasser werden in einen 50 ml Rundkolben 0,37 ml (0,27 g, 2,7 mmol) Triethylamin und 0,52 g (6 mmol) Glycidamid gegeben. Der pH-Wert der Lösung beträgt etwa 10. Es wird 6 Tage bei Raumtemperatur gerührt. Die Fällung des Rohproduktes erfolgt mit 100 ml Aceton. Das Rohprodukt wird mit einem Büchnertrichter abgenutscht, mit Aceton gewaschen und im Vakuum der Wasserstrahlpumpe getrocknet. Es wird ein weißer Feststoff erhalten.

Stufe 2: *N*-2-Aminocarbonyl-2-hydroxyethyl-L-d₇-valyl-pentafluorphenyl-thiohydantoin (GAd₇Val-PFPTH)

In einem 100 ml Dreihalskolben mit Rückflusskühler und Innenthermometer werden 38 ml 0,5 M NaHCO₃-Lösung und 20 ml 1-Propanol mit 0,15 g (0,73 mmol) *N*-2-Aminocarbonyl-2-hydroxyethyl-L-d₈-valin (GAd₈Val) versetzt. Unter Rühren wird die Lösung im Wasserbad auf 45°C erwärmt. Es werden 0,42 ml (0,67 g; 2,9 mmol) PFPTC hinzugefügt und 3 h rühren gelassen. Anschließend wird das Reaktionsgemisch im Eisbad abgekühlt.

Die wässrige Lösung wird viermal mit jeweils 50 ml n-Hexan ausgeschüttelt. Die organischen Extrakte werden vereinigt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von 30°C entfernt. Das Rohprodukt wird 1½ h im Ölpumpenvakuum getrocknet.

Der viskose Rückstand wird an einer Kieselgelsäule (40 x 2,5 cm; n-Hexan/Ethylacetat 1/5, v/v) chromatographisch gereinigt. Die Kontrolle der Trennung erfolgt mittels DC. Das kristalline Thiohydantoin zeigt einen R_f-Wert von 0,1.

GAd₇Val-PFPTH wird zur Kalibrierung bei der Anwendung des Edman-Abbaus verwendet.

Weitere Umsetzung zu (1-(2,2-Dimethyl-oxazolidin-4-on-5-yl)-methyl-5-d₇-isopropyl-3-pentafluorphenyl-2-thiohydantoin) (acGAd₇Val-PFPTH)

Die Synthese von acGAd₇Val-PFPTH erfolgt für die analytische Methodenentwicklung. 50 mg GAd₇Val-PFPTH werden in einem 50 ml Spitzkolben mit 3 ml 1% H₂SO₄ in Aceton versetzt und 3 Stunden bei Raumtemperatur gerührt.

Die Neutralisation des Reaktionsgemisches erfolgt mit 5 ml einer 0,1 M Natriumcarbonatlösung. Das Produkt wird dreimal mit je 5 ml Toluol extrahiert. Die vereinigten Toluolphasen werden zweimal mit 15 ml Wasser gewaschen. Nach Entfernung des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wird das verbliebene Wasser mittels Gefriertrocknung entfernt.

4.2 Synthese der Dipeptid-Derivate zur Standardisierung

4.2.1 Geräte, Chemikalien und Materialien

Geräte

Gefriertrocknung	Alpha 1050 [Christ]
Labor-Glasgeräte	diverse Duranglas
Magnetrührer mit Heizplatte	MR 3001 K [Heidolph]
NMR-Messröhrchen	
NMR-Spektroskop	DPX 400 [Bruker]
Rotationsverdampfer	Rotavapor RE 111 [Büchi]

Chemikalien

Aceton	technisch
Acrylamid	p.a. [Merck]
N-2-Aminocarbonylethyl-L-valin	Eigensynthese [s. Kap. 4.2.7]
N-2-Aminocarbonyl-2-hydroxyethyl-L-valin	Eigensynthese [s. Kap. 4.2.7]
BOC-L-d ₈ -valin	Eigensynthese [s. Kap. 4.2.2]
BOC-L-d ₈ -valyl-L-leucin-p-nitroanilid	Eigensynthese [s. Kap. 4.2.3]
Citronensäure	p.A. [Merck]
Dichlormethan	p.A. [Merck]
N,N'-Dicyclohexylcarbodiimid	99% [Aldrich]
Diethylether	technisch
Dioxan	p.A. [Merck]
Di-tert-butylidicarbonat	99,0% [Aldrich]
DMF	wasserfrei
Ethylacetat	technisch
Glycidamid	synthetisiert von J.Zeller, M.Redeker; AK Eisenbrand
HCl konz.	37% [J.T. Baker]
n-Hexan	95% [J.T. Baker]
1-Hydroxybenzotriazol	≥ 98,0% [Fluka]
Kupfer(II)tetrafluorborat-hexahydrat	99%
L-Leucin-p-nitroanilid	≥ 99%, BioChemika [Fluka]
Methanol	p.a. [Merck]
NaCl	p.A. [Merck]
NaOH	techn. [Riedel - de Haën]
Na ₂ SO ₄	p.A. [Merck]
Petrolether	technisch, Siedebereich 30-70 °C
THF	[J.T. Baker]
Triethylamin	zur Synthese [Merck]
L-Valin	≥ 98%, Reagent grade [Sigma]
L-d ₈ -Valin	98 atom % D [Isotec]
L-d ₈ -Valyl-L-leucin-p-nitroanilid	Eigensynthese [s. Kap. 4.2.4]
Wasser	bidestilliert

Verbrauchsmaterialien

Kieselgel	Partikelgröße 0,040-0,063 mm [Macherey und Nagel]
Kieselgel	Partikelgröße 0,063-0,2 mm [Macherey und Nagel]
SPE-RP18-Phase	Chromabond, 500 mg, 3 ml [Macherey und Nagel]
SPE-RP18e-Phase	Chromabond, 300 mg, 1,5 ml [Macherey und Nagel]

Synthesevariante 1:

4.2.2 Synthese von *tert*-Butoxycarbonyl-L-d₈-valin (BOC-L-d₈-valin)

4.2.2.1 Arbeitsvorschrift

In einem 100 ml Rundkolben werden zu 1 g (8,0 mmol) L-d₈-Valin in 30 ml Dioxan/Wasser (2:1; v/v) 2,4 g (11 mmol) Di-*tert*-butyldicarbonat gegeben und 10 ml 1 N Natronlauge unter Rühren und Eiskühlen zugetropft. Anschließend wird 3 h bei RT gerührt.

Das Dioxan wird im Vakuum abgedampft. Die verbleibende alkalisch wässrige Lösung wird zweimal mit 5 ml Petrolether zur Entfernung des überschüssigen Di-*tert*-butyldicarbonats ausschüttelt.

Unter Eiskühlung wird die Lösung mit einer Citronensäure-Lsg. (1 g/ml) bis pH 2-3 angesäuert und mit 10 ml Ethylacetat überschichtet. Die wässrige Phase wird im Scheidetrichter abgetrennt und noch zweimal mit 5 ml Ethylacetat extrahiert. Die wässrige Phase wird verworfen.

Die vereinigten Ethylacetatphasen werden im Vakuum einengt. Der Rückstand wird eingefroren und gefriergetrocknet. Es verbleibt eine zähflüssige farblose Flüssigkeit. [Börner, 2002]

4.2.3 Synthese von BOC-L-d₈-valyl-L-leucin-p-nitroanilid

Während sämtlicher nachfolgender Reaktionsschritte wird die Lichteinwirkung auf ein Minimum beschränkt.

4.2.3.1 *Arbeitsvorschrift*

In einem 100 ml Rundkolben werden 900 mg (3,98 mmol) BOC-L-d₈-Valin, 1000 mg (3,98 mmol) L-Leucin-p-nitroanilid und 538 mg (3,98 mmol) 1-Hydroxybenzotriazol in 6 ml DMF gelöst und bei 0 °C mit 0,55 ml Triethylamin versetzt. Anschließend wird langsam eine Lösung von 848 mg (4,36 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in 8,8 ml Dichlormethan zugetropft und 1 h bei 0 °C sowie 3 h bei RT nachgerührt. Der Ansatz wird über Nacht bei RT stehen gelassen. Der ausgefallene Harnstoff wird abfiltriert. Das Filtrat wird eingeeengt. [Börner, 2002]

Der Rückstand wird mittels Säulenchromatographie (Kieselgel der Korngröße 0,04-0,63 mm; 45 x 3,5 cm Füllhöhe) gereinigt. Der Rückstand wird dazu in einer Mischung aus 40 ml Ethylacetat und 15 ml Methanol gelöst und an 12 g Kieselgel 60 der Korngröße 0,063-0,2 mm adsorbiert. Die Aufreinigung des Produktes erfolgt mit dem Fließmittel n-Hexan/Ethylacetat (1/3, v/v). Das Produkt wird mit reinem Ethylacetat und dem Fließmittel Ethylacetat/Methanol (1/1, v/v) eluiert. Das Eluat wird eingeeengt und gefriergetrocknet.

4.2.4 **Synthese von L-d₈-Valyl-L-leucin-p-nitroanilid**

4.2.4.1 *Arbeitsvorschrift*

Es werden 1,15 g (2,6 mmol) des BOC-L-d₈-valyl-L-leucin-p-nitroanilids in einem 5-fach molaren Überschuss mit 4N HCl/Essigester gelöst. Die Lösung wird über Nacht bei RT Rühren gelassen. Nach vollständiger Deblockierung (DC-Kontrolle) wird die Lösung mit 1 N NaOH auf pH 9 eingestellt. Das Produkt wird mit dreimal 50 ml Ethylacetat extrahiert und die Lösung am Rotationsverdampfer zur Trockne eingeeengt. Der Rückstand wird mit 30 ml Methanol und 30 ml Wasser versetzt. Der Methanolanteil wird mittels Rotationsverdampfer so weit reduziert, bis eine leichte Trübung auftritt. Dieses Gemisch wird mittels SPE gereinigt. Die Säulenkonditionierung erfolgt mit 6 ml Methanol und 6 ml Wasser. Es werden 2 ml der Produktlösung auf die SPE-Säule gegeben. Nach Waschen mit 4 ml Wasser wird die Substanz mit 2 ml Methanol eluiert. Die SPE-Kartusche (RP-18) wird mit 3 ml Methanol und 3 ml Wasser gespült und erneut verwendet. Das Methanol wird mittels Rotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von 40 °C entfernt. Nach Zugabe von Wasser wird die Substanz gefriergetrocknet.

4.2.5 Synthese von *N*-2-Aminocarbonylethyl-L-d₈-valyl-L-leucin-p-nitroanilid und *N*-2-Aminocarbonyl-2-hydroxyethyl-L-d₈-valyl-L-leucin-p-nitroanilid

4.2.5.1 Arbeitsvorschrift

Jeweils 80 mg L-d₈-Valyl-L-leucin-p-nitroanilid (0,223 mmol) werden in je einem 50 ml Rundkolben zunächst in einer Mischung aus 2 ml Methanol und 1 ml Wasser gelöst [Friedman und Romersberger, 1967]. Es werden 18 mg Acrylamid (0,257 mmol) bzw. 24 mg Glycidamid (0,276 mmol) zugefügt. Durch Zugabe von 30 µl (0,02 g, 0,2 mmol) Triethylamin wird ein pH-Wert von 8-9 erreicht. Beide Ansätze werden 5 Tage bei RT gerührt und anschließend über Nacht offen in Abzug aufbewahrt. Die beiden Ansätze werden am Rotationsverdampfer bei einer Wasserbadtemperatur von 40°C eingeeengt. Die Rohprodukte werden säulenchromatographisch an Kieselgel gereinigt (Kieselgel 60, 1,5 x 10 cm). Es wird ein Fließmittelgradient, beginnend mit Ethylacetat/n-Hexan (8/1; v/v), verwendet. Nach Elution der gelben Fraktion wird auf 100% Ethylacetat umgestellt. Nach Elution von weiteren 20 ml wird das gewünschte Produkt durch Einsatz von Methanol als Elutionsmittel gewonnen. Fraktionen, die ausschließlich das Produkt enthalten werden vereint und nach Entfernen des Methanols im Rotationsverdampfer gefriergetrocknet (EE/Hex 1/1, v/v; R_f 0,1).

Synthesevariante 2:

4.2.6 Synthese von *N*-2-Aminocarbonylethyl-L-Valin (AAVal) und *N*-2-Aminocarbonyl-2-hydroxyethyl-L-Valin (GAVal)

4.2.6.1 Arbeitsvorschrift

Es werden je Ansatz 1,17 g (10 mmol) L-Valin zusammen mit 2,12 g (30 mmol) Acrylamid bzw. 1,24 g (14 mmol) Glycidamid in 50 ml-Rundkolben eingewogen. Nach Zugabe von 20 ml Wasser und 1,73 ml (1,26 g, 12,5 mmol) Triethylamin werden die Reaktionsansätze 7 Tage bei RT gerührt. Die Ausfällung des Produktes erfolgt mit jeweils 200 ml Aceton. Die Ansätze werden für 2 Stunden stehen gelassen und anschließend zentrifugiert (2000 rpm, 3 min, RT). Die Rückstände werden zweimal

mit je 15 ml Aceton gewaschen und nochmals zentrifugiert. Nach Abdampfen des Acetons bei RT werden die jeweiligen Produkte erhalten.

4.2.7 Synthese von *N*-2-Aminocarbonylethyl-L-valyl-L-leucin-p-nitroanilid und *N*-2-Aminocarbonyl-2-hydroxyethyl-L-valyl-L-leucin-p-nitroanilid

4.2.7.1 Arbeitsvorschrift

In einem 100 ml Rundkolben werden 800 mg (4,25 mmol) *N*-2-Aminocarbonylethyl-L-Valin (AAVal), 1068 mg (4,25 mmol) L-Leucin-p-nitroanilid und 574 mg (4,25 mmol) 1-Hydroxybenzotriazol in 6 ml DMF gelöst und bei 0°C mit 0,55 ml (0,4 g, 4,0 mmol) Triethylamin versetzt. Anschließend wird langsam eine Lösung von 947 mg (4,59 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in 9 ml Dichlormethan zugetropft und 1 h bei 0°C sowie 3 h bei RT nachgerührt.

Entsprechend wird ein Ansatz, der 800 mg (3,92 mmol) *N*-2-Aminocarbonyl-2-hydroxyethyl-L-Valin (GAVal) sowie 985 mg (3,92 mmol) L-Leucin-p-nitroanilid und 530 mg (3,92 mmol) 1-Hydroxybenzotriazol enthält mit 874 mg (4,23 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) versetzt.

Die Reaktionsansätze werden über Nacht bei RT stehen gelassen. Der ausgefallene Harnstoff wird abfiltriert und die Filtrate nach Aufbewahrung bei 4°C über Nacht zentrifugiert (2000 rpm, 3 min, RT). Die resultierenden Lösungen werden zunächst mittels Rotationsverdampfer eingeengt und anschließend am Vakuum der Ölpumpe bis zur Trockne eingeengt. [Börner, 2002]

4.3 Modifizierter Edman-Abbau

4.3.1 Geräte, Chemikalien und Materialien

Geräte

Brutschrank	Cytoperm 8088 [Heraeus]
GC/MS	6890 [Agilent] / 5973 inert [Agilent] mit Software Chem Station
GC-Säule	DB-XLB, 30 m x 0,25 mm ID, 0,25 µm Filmdicke [J&W Scientific]
Gefriertrocknung	Alpha 1050 [Christ]
Kühlschrank	[Liebherr]
Labor-Glasgeräte	diverse Duranglas
LC/MS/MS	HPLC: Series 200 Micro Pump [Perkin Elmer] Series 200 Autosampler [Perkin Elmer] UV/Vis Detektor 785 A [Perkin Elmer] MS: API 2000 [Applied Biosystems] mit APCI Interface
LC-Säule	LiChrospher 100 RP-18, 125 × 4 [Merck]
pH-Elektrode	pH 522 [WTW]
Pipetten	[Abimed]
Schüttelapparatur	Typ 3015 [GFL]
Vakuumkammer	Macherey und Nagel
Vortex	Vortex Genie 2 [Scientific Industries]
Waage	CP 224 S [Sartorius]
Wasserbad	Köttermann
Zentrifuge	Megafuge 1.0R [Heraeus] Centrifuge 5804 R [Eppendorf]

Chemikalien

AAd ₇ Val-PFPTH	Eigensynthese [s. Kap. 4.1.3]
Aceton	für die Spektroskopie [Merck]
Aceton	technisch (nur für Variante C)
GAd ₇ Val-PFPTH	Eigensynthese [s. Kap. 4.1.4]
Acrylamid	p.A. [Merck]
Diethylether	p.A. [Riedel de Haën]
Dikaliumhydrogenphosphat	p.a. [Merck]
Ethylacetat	p.A. [J.T. Baker]
Formamid	p.A. [Merck]
acGAd ₇ Val-PFPTH	Eigensynthese [s. Kap. 4.1.4]
Glycidamid	synthetisiert von P. Mertes [AK Eisenbrand]
Helium	5.0 [Air Liquide]
n-Hexan	p.A. [J.T. Baker]
Kaliumhydrogenphosphat	p.a. [Merck]
Methan	4.5 [Air Liquide]
Natriumcarbonat	p.A. [Riedel de Haën]
Natriumchlorid	p.a. [Merck]
Natriumhydrogencarbonat	p.A. [Riedel de Haën]
Natriumhydroxid	p.a. [Merck]
PFPITC	purum ≥ 97.0 % (GC) [Fluka]
2-Propanol	p.a. [Merck]
Salzsäure	konz. [J.T. Baker]
Schwefelsäure	konz. [J.T. Baker]
Stickstoff	technisch [Messer]
Toluol	für die Spektroskopie [Merck]
Trockeneis	(nur für Variante C)
Wasser	bidestilliert

Gebrauchslösungen

Lösungen zur internen Kalibrierung	2 mg der Standardsubstanzen (AA-d ₇ -Val-PFPTH; GA-d ₇ -Val-PFPTH) werden in 100 ml Methanol gelöst und 1:100 verdünnt
0,9%ige Natriumchloridlösung	

gesättigte Natriumchloridlösung	bidest. Wasser wird mit NaCl versetzt bis ein Bodensatz entsteht
0,1 M Natriumhydrogenlösung	
1 M Natronlauge	
Phosphatpuffer	0,5 M K_2HPO_4 (43,55 g auf 500 ml bidest. H_2O) mit 0,5 M KH_2PO_4 (6,805 g auf 100 ml bidest. H_2O) auf pH 7,4 eingestellt
50 mM Salzsäure in 2-Propanol	
0,1 M Sodalösung	
1%ige Schwefelsäure in Aceton	

Verbrauchsmaterialien

Kanülen zur Blutabnahme	Multifly®-Set [Sarstedt]
Materialien zur SPE	a) SiOH; unmodifiziertes Kieselgel; 6 ml / 500mg; Chromabond; Macherey-Nagel b) C18; Octadecyl-modifiziertes Kieselgel; 6 ml / 500mg; Chromabond; Macherey-Nagel c) C18 ec; Octadecyl-modifiziertes Kieselgel endcapped; 6 ml / 500mg; Chromabond; Macherey-Nagel
Material zur Flüssig/Flüssig-Extraktion	d) XTR; Kieselgur für flüssig-flüssig Extraktionen; 15 ml / 3000 mg; Chromabond; Macherey-Nagel
Monovetten	mit EDTA [Sarstedt]
Pipettenspitzen	verschiedene Größen [Greiner Bio-One GmbH]
Reaktionsgefäße	1,5 ml und 2 ml [Greiner Bio-One GmbH]
Vials	13 ml [Sarstedt]
Vials	15, 50 ml [Greiner Bio-One GmbH]
Vials	1,5 ml Braunglasvials mit Schraubgewinde mit 300 µl Glaseinsatz sowie Plastikdeckel und Septum aus PTFE und Silikon

4.3.2 Durchführung

4.3.2.1 Blutentnahme

Den Probanden wurde im Sitzen nach proximaler Stauung und Palpation der Armvene, sowie Desinfektion der Einstichstelle, über eine Multifly-Kanüle die

benötigte Menge Blut in EDTA-Monovetten (9 ml) abgenommen. Das Blut in den EDTA-Monovetten wurde sofort wie folgend beschrieben weiter aufgearbeitet.

4.3.2.2 Herstellung der AA- bzw. GA-Inkubationslösungen

Zur Herstellung der Inkubationslösungen werden AA bzw. GA in Phosphatpuffer so gelöst und entsprechend verdünnt, dass Inkubationslösungen resultieren, die so konzentriert sind, dass durch Zugabe von 20 µl der verdünnten Lösung zu 2 ml Vollblut die gewünschte AA- bzw. GA-Konzentration resultiert.

4.3.2.3 Inkubation der humanen Blutproben mit AA und GA

Nach Zugabe von 20 µl der AA- bzw. GA-Lösung in Phosphatpuffer werden die Blutproben vorsichtig gerollt und für einen definierten Zeitraum im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt. Der Abbruch der Inkubation erfolgt durch sofortige Weiteraufarbeitung der Proben. Für eine erste Serie von Proben, die nach erfolgter Aufarbeitung mit LC/MS/MS vermessen wurden, erfolgte die Inkubation mit 30 µM, 300 µM und 3 mM Acrylamid bzw. Glycidamid für 6 h, 24 h oder 72 h. Bei einer zweiten Serie von Proben, deren Messung mittels GC/MS erfolgte, wurde mit 0,3 µM, 3 µM und 10 µM Acrylamid bzw. Glycidamid für 1 h oder 4 h inkubiert. Für jeden Spender wurden jeweils für die Inkubation mit Acrylamid oder Glycidamid pro Konzentration sowie der Hintergrundbelastung vier voneinander unabhängige Proben aufgearbeitet.

4.3.2.4 Aufarbeitung der Blutproben

Die Blutproben werden bei 800 g (2400 rpm) für 5 Minuten bei RT zentrifugiert. Nach Entfernen des Plasmas werden die Erythrocyten durch dreimaliges Waschen mit 2 ml 0,9%iger Natriumchloridlösung von den vorhandenen Plasmaresten gereinigt. Nach jedem Waschschrift erfolgt eine Zentrifugation bei 800 g (2400 rpm) für 5 Minuten bei RT. Die Lyse der Erythrocyten erfolgt durch Zugabe von 2 ml bidest. Wasser, Behandlung mit dem Vortex und Lagerung bei -20°C für 30 Minuten. Nach dem Auftauen werden die Proben nochmals mit dem Vortex behandelt. Zu dem Hämolysat werden 10 ml einer 50 mM HCl in 2-Propanol gegeben und die Mischung wird zur Extraktion des Hämoglobins kräftig geschüttelt. Nach Zentrifugation bei 3500 g (5000 rpm) für 10 Minuten bei RT wird der Überstand in 50 ml Vials dekantiert und nach Zugabe von 8 ml Ethylacetat zur vollständigen Ausfällung des Hämoglobins für

2 Stunden bei 4 °C gelagert. Es wird bei 1250 g (3000 rpm) für 5 Minuten bei RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das entstandene Hämoglobinpellet wird zweimal mit 5 ml Ethylacetat und zweimal mit 5 ml n-Hexan gewaschen. Dabei wird mit dem Vortex behandelt um eine optimale Reinigung des Hämoglobins zu gewährleisten. Die Proben werden zur Trocknung offen bei Raumtemperatur im Abzug belassen. Eine Menge von ungefähr 50 mg Hämoglobin wird genau in 13 ml Vials eingewogen und in 3 ml Formamid gelöst. Die Lösung wird mit 40 µl 1 M NaOH und 15 µl PFPITC versetzt und für 24 Stunden auf einer Schüttelapparatur durchmischt. Nach Ablauf der Derivatisierungszeit wird 20 µl der Standardlösung zur internen Kalibrierung hinzugefügt. Die Probe wird für 90 Minuten bei 45 °C in einem Schüttelwasserbad bewegt. Nach Zugabe von 400 µl einer gesättigten wässrigen NaCl-Lösung zur Verbesserung der Extraktion wird zweimal mit 3 ml Diethylether extrahiert. Dazu wird mit dem Vortex behandelt und anschließend bei 4500g (5700 rpm) für 3 Minuten bei RT zentrifugiert. Die vereinigten Etherphasen werden unter Stickstoff getrocknet. Die Probe wird in 200 µl 1%iger Schwefelsäure in Aceton aufgenommen und 24 Stunden bei RT gelagert. Nach Neutralisation mit 300 µl 0,1 M NaHCO₃-Lösung wird 1,5 ml Toluol zugefügt und mit dem Vortex behandelt. Die Toluolphase wird zweimal mit 2 ml Wasser gewaschen und nach dem zweiten Waschschrift in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert. Die Probe wird unter Stickstoff bis zur Trockne eingeeengt. Zu dem Rückstand werden 100 µl Toluol gegeben. Die Probe wird zunächst mit dem Vortex behandelt, dann für 5 Minuten im Ultraschallbad behandelt und anschließend bei 3500 g (5000 rpm) für 10 Minuten bei RT zentrifugiert. Der Überstand wird in 1,5 ml Braunglasvials mit 300 µl Glaseinsatz pipettiert. Die Messung der Proben erfolgte mit GC/MS (s. Kap 4.3.2.6). [Bergmark *et al.*, 1993, Schettgen *et al.*, 2002]

Abweichend von der in diesem Abschnitt beschriebenen Aufarbeitung der Blutproben kamen nachfolgende Varianten zum Einsatz:

Variante A (LCMS)

Bei der Inkubation der Blutproben wurde das Blut mit einer Lösung von AA bzw. GA in Phosphatpuffer im Verhältnis 1:1 (v/v) verdünnt. In der resultierenden Probenlösung betrug die AA- bzw. GA-Konzentration 30 µM, 300 µM oder 3 mM.

Zur Extraktion des Hämoglobins wurden 2 ml Hämolysat mit 12 ml 50 mM HCl in 2-Propanol ausgeschüttelt. Das gereinigte Hämoglobin wurde gefriergetrocknet.

Zur internen Kalibrierung wurde nur AAd₇Val-PFPTH verwendet, da die entsprechende deuterierte GA-Verbindung zu diesem Zeitpunkt noch nicht verfügbar war. Den Proben wurden 100 µl AAd₇Val-PFPTH (25 µg, 250 µg bzw. 2,5 mg / 10 ml Methanol) zugegeben. Vor der Extraktion der Probe mit Diethylether wurde keine gesättigte Natriumchloridlösung zugefügt.

Das durch die Derivatisierung mit PFPITC generierte GAVal-PFPTH wurde keiner säurekatalysierten Umsetzung mit Aceton unterworfen, sondern direkt vermessen.

Die getrocknete Probe wurde zur Messung in 400 µl Toluol aufgenommen. Die Messung der Proben erfolgte mit LC/MS/MS.

Variante B (2 Waschschritte)

Nach dem Trocknen des Diethyletherextrakts wird die Probe in 1,5 ml Toluol aufgenommen und mit 2 ml bidest. Wasser sowie 2 ml frisch angesetzter 0,1 M Sodalösung gewaschen. Die Toluolphase wird erneut unter Stickstoff bis zur Trockne eingeeengt und erst dann wie beschrieben säurekatalysiert mit Aceton derivatisiert.

Die Messung der Proben erfolgte mit GC/MS.

Variante C (Destillationsmethode)

Zur besseren Abtrennung der biologischen Probenmatrix wird eine Wasserdampfdestillation unter Vakuum durchgeführt. Die Aufarbeitung der Proben erfolgt wie unter Variante A beschrieben. Nach erfolgter Derivatisierung der Analyten mit PFPITC wird die Probe, die zu diesem Zeitpunkt im wesentlichen aus Formamid besteht, in einen 250 ml Rundkolben überführt. Kurz vor der Destillation werden 20 ml Wasser zugegeben. Der Rundkolben wird in einem Wasserbad (50 °C) an die Destillationsbrücke angeschlossen. Die Destillation erfolgt für 45 min unter Vakuum in eine Vorlage, die sich in einem Kühlbad aus Aceton mit Trockeneis befindet.

Die Messung der Proben erfolgte mit LC/MS/MS.

Variante D (SPE und Flüssig/Flüssig-Extraktion an XTR)

a) Test der Materialien mit einer Standardprobe ohne Probenmatrix

Die Probe zur Testung der verschiedenen Phasenmaterialien setzte sich aus 3 ml Formamid, 30 µl 1 M Natronlauge und 20 µl AAd₇Val-PFPTH (2,5 mg / 10 ml) zusammen und ist damit abgesehen von der fehlenden Hämoglobinmatrix einer realen Probe nachempfunden.

Die verwendeten Verfahren orientieren sich an den für die einzelnen Phasenmaterialien üblicherweise verwendeten Standardprotokollen.

- SiOH-Normalphase: Konditionierung mit 5 ml n-Hexan, Aufgabe der Probe, Waschen mit 3 ml n-Hexan, Trocknen am Vakuum für 5 min, Elution mit 7 ml Diethylether;
- C18/C18ec-Umkehrphase: Konditionierung mit 2 ml Methanol, Hydrophilisierung mit 2 ml bidest. Wasser, Aufgabe der Probe, Waschen mit 1,5 ml bidest. Wasser, Trocknen am Vakuum für 5 min, Elution mit 7 ml Diethylether;
- XTR-Material zur Flüssig/Flüssigextraktion: Aufgabe der Probe, Einwirkzeit 5 min, Elution mit 10 ml Diethylether.

Nach Trocknung der Diethyletherphasen werden die Proben in 500 µl Toluol aufgenommen. Als Vergleichsprobe, die einer vollständigen Wiederfindung entspricht, werden 20 µl AAd₇Val-PFPTH (2,5 mg / 10 ml) mit 500 µl Toluol versetzt. Die Messung der Proben erfolgte mit LC/MS/MS.

b) Test ausgewählter Materialien mit einer realen Hämoglobinprobe

In den wie unter a) zusammengesetzten Proben wird zusätzlich 50 mg Hämoglobin gelöst.

- C18-Umkehrphase: Konditionierung mit 2 ml Methanol, Hydrophilisierung mit 2 ml bidest. Wasser, Aufgabe der Probe, Waschen mit 1,5 ml bidest. Wasser, Trocknen am Vakuum für 5 min, Elution mit 8 ml Diethylether;
- XTR-Material zur Flüssig/Flüssigextraktion: Aufgabe der Probe, Einwirkzeit 5 min, Elution mit 10 ml Diethylether.

Nach Trocknung der Diethyletherphasen werden die Proben in 500 µl Toluol aufgenommen. Als Vergleichsprobe, die einer vollständigen Wiederfindung entspricht, werden 20 µl AAd₇Val-PFPTH (2,5 mg / 10 ml) mit 500 µl Toluol versetzt. Die Messung der Proben erfolgte mit LC/MS/MS.

c) Vergleich der Aufarbeitung mit XTR-Phase mit der Standardaufarbeitung

Aufgearbeitet wurden nur reale Blutproben. Nach der allgemeinen Vorschrift des modifizierten Edman-Abbaus wurde die Probe nach Derivatisierung mit Diethylether ausgeschüttelt und anschließend weiteren Waschschritten unterworfen. Parallel dazu wurden diese Arbeitsschritte durch die Aufreinigung an der XTR-Phase ersetzt.

Zum Zeitpunkt der Derivatisierung setzte sich die Probe folglich aus 3 ml Formamid, 30 µl 1 M Natronlauge, 20 µl AAd₇Val-PFPTH (0,025 mg / 10 ml), 15 µl PFPITC sowie 50 mg Hämoglobin zusammen.

- XTR-Aufarbeitung: Aufgabe der Probe, Einwirkzeit 5 min, Elution mit 15 ml Diethylether.

Variante E (interne Kalibrierung mit Dipeptidstandards)

Die Aufarbeitung der Blutproben erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift des modifizierten Edman-Abbaus. Die Zugabe von 20 µl der Dipeptidstandardlösungen (0,076 mg AAd₈Dipeptid bzw. 0,042 mg GAd₈Dipeptid/ 100 ml Methanol) anstelle der entsprechenden PFPTH-Standards erfolgte zu Beginn des Derivatisierungsschrittes mit PFPITC, von dem ein Volumen von 20 µl zugegeben wurde. Die Messung der Proben erfolgte mit GC/MS. Bei der Auswertung wurde die Reinheit des AAd₈Dipeptids berücksichtigt.

Variante F (Proben aus der Studie zur Untersuchung der Toxikokinetik von Acrylamid)

Die im Rahmen der in Kapitel 4.4 beschriebenen Studie generierten Blutproben der teilnehmenden Probanden wurden gemäß des Standardprotokolls bis zur Hämolyse im Klinikum der Universität zu Köln, Institut für Pharmakologie, vorbereitet. Die Proben wurden in gefrorenem Zustand an die Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie versandt. Die weitere Aufarbeitung erfolgte nach Standardprotokoll (vgl. 4.3.2.4) im Hause.

4.3.2.5 Messung der Pentafluorphenylthiohydantoinderivate von AA und GA mit LC/MS/MS

Die Messungen wurden mit einem Triple-Quadrupol-Gerät (API 2000 mit PE Sciex Analyst Software) durchgeführt. Als Ionisationsverfahren wurde die negative chemische Ionisation bei Atmosphärendruck (APCI) eingesetzt. Die Optimierung des Gerätes auf die Analyten wurde mittels Direkteinspritzung (Flow-Injection Analysis) durchgeführt, bei der die Analytlösung zunächst ohne vorgeschaltete HPLC-Trennung kontinuierlich in das System gepumpt wird. Es wurden die in der folgenden Tabelle dargestellten Werte für die optimierten Geräteparameter erhalten (Tabelle 6).

Tabelle 6: Geräteparameter LC/MS

Geräteparameter	Methode AAMRM	Methode GAMRM
APCI-Quellentemperatur	480 °C	400 °C
Curtain Gas	24,00	15,00
Nebulizer Current	-4,00	-4,00
Gas 1	59	62
Gas 2	48	3
ihe	1,00	1,00
CAD	8,00	8,00
Declustering Potential	-20,00	-20,00
Focussing Potential	-390,00	-380,00
Entrance Potential	-7,00	-9,00
CXP	-9,00	-6,00
CEP	-18,00	-25,00
CE	-28,00	-20,00
Dwellzeit	50 ms	50 ms

Als chromatographisches System wurde verwendet: eine LiChrospher 100 RP-18 Säule [Merck], Fließmittel: Methanol/Wasser/Ameisensäure 80/19,8/0,2 (v/v/v), Fließgeschwindigkeit: 500 µl/min, Injektionsvolumen: 25 µl, Dauer der Messung: 14 min. Mit Multiple Reaction Monitoring als Betriebsmodus wurden die in der folgenden Tabelle aufgeführten charakteristischen Übergänge zur Quantifizierung der Pentafluorphenylthiohydantoine genutzt (Tabelle 7).

Tabelle 7: MRM-Übergänge zur Quantifizierung der PFPTHs von AA und GA mittels LC/MS

AAVal-PFPTH	394 m/z → 275 m/z; 394 m/z → 303 m/z
AAd ₇ Val-PFPTH	401 m/z → 281 m/z; 401 m/z → 310 m/z
GAVal-PFPTH	410 m/z → 206 m/z; 410 m/z → 182 m/z

Der in der Tabelle Tabelle 7 jeweils zuerst angegebene Übergang fand für die Quantifizierung Anwendung, der jeweils zweite Übergang zur zusätzlichen Absicherung der Peakcharakterisierung. Die Analyten AAVal-PFPTH und GAVal-PFPTH wurden über ihre Signalfächen relativ zu den Flächen der Signale des internen Standards AAd₇Val-PFPTH quantifiziert.

4.3.2.6 Messung der Pentafluorphenylthiohydantoinderivate von AA und GA mit GC/MS

Die Messungen wurden mit einem GC/MS-Gerät der Firma Agilent (6890 / 5973 inert mit Software ChemStation) durchgeführt. Das Messprinzip beruht auf der Quadrupol-Technik (s. Kap. 3.4.3 und 3.4.5). Die GC-Trennung erfolgte auf einer XLB-Säule mit Helium als Trägergas mit einem Flow von 1,3 ml / min (entspricht ca. 13,7 psi). Als Ionisierungsmodus fand die negative chemische Ionisation mit Methan als Reaktandgas Anwendung. Der Methananteil in der Ionenquelle beträgt 45%. Das Injektionsvolumen von 1 µl wird mittels Autosampler in den auf 250°C eingestellten PTV-Injektor eingebracht, der im Pulsed Splitless Modus arbeitet. Der Druckimpuls beträgt 30 psi für 1 min. Die GC-Säule ist zunächst für die Dauer von 1 min auf 90°C temperiert. Mit einer Heizrate von 25°C / min wird der Ofen auf 120°C gebracht. Mit 10°C / min wird auf 240°C geheizt. Die maximale Temperatur von 310°C wird mit einer Rate von 25°C / min erreicht und für 5 min gehalten. Die Gesamtlaufzeit einer Analyse beträgt 22 min. Der Solvent Delay zur Schonung der Ionenquelle ist auf 15 min eingestellt.

Das Interface wird konstant auf 280°C gehalten. Die MS-Ionenquelle und der Quadrupol sind auf 150°C temperiert. Es wird mit Hochauflösung gemessen. Die Detektion erfolgt bei der Methode AAHaemo ausschließlich zwischen Minute 17 und 18 und bei der Methode GAHaemo ausschließlich zwischen Minute 18 und 19.

Es werden die folgenden Methoden verwendet (Tabelle 8).

Tabelle 8: Übersicht der verwendeten GC/MS-Methoden

Methode	Analyten	m/z	Dwell Time*
HaemoglobinaddukteSIM	AAVal-PFPTH	375	70
	AAd ₇ Val-PFPTH	382	70
	acGAVal-PFPTH	431	70
	acGAd ₇ Val-PFPTH	438	70
AAHaemo	AAVal-PFPTH	375	130
	AAd ₇ Val-PFPTH	382	70
GAHaemo	acGAVal-PFPTH	431	130
	acGAd ₇ Val-PFPTH	438	70

*Parameter zur Beschreibung der Datenpunkte pro Peak

4.3.2.7 Validierung der GC/MS-Messmethoden

Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen aus den Kalibriergeraden

Zur Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen werden von AAd₇Val-PFPTH und acGAd₇Val-PFPTH methanolische Lösungen hergestellt. Für AAd₇Val-PFPTH werden die Konzentrationen 0,1 pg/μl (0,3 fmol abs.), 0,2 pg/μl (0,5 fmol abs.), 0,4 pg/μl (1,0 fmol abs.), 1,2 pg/μl (3,0 fmol abs.) und 2 pg/μl (5,0 fmol abs.) verwendet, für acGAd₇Val-PFPTH die Konzentrationen 1 pg/μl (2,2 fmol abs.), 2,5 pg/μl (5,5 fmol abs.), 5,0 pg/μl (10,9 fmol abs.), 7,5 pg/μl (16,4 fmol abs.) und 10 pg/μl (21,8 fmol abs.). Die Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen erfolgt nach der Methode gemäß der DIN-Vorschrift 32645 [Gottwald, 2000].

Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen in der Probenmatrix

Zu Hämoglobinproben eines Probanden werden definierte Mengen von AAVal-PFPTH und acGAAVal-PFPTH (5 pg) zugegeben. Für die Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen in der Probenmatrix werden der Messwert, bei dem nach Dotierung kein Anwachsen des Signals in Relation zur HGB gemessen wird sowie die Messwerte, bei denen nach Dotierung eine Signalvergrößerung feststellbar ist, berücksichtigt. Die Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen erfolgt unter Verwendung der Peakflächendifferenzen gemäß der DIN-Vorschrift 32645 [Gottwald, 2000].

Bestimmung der Varianzen

Die Varianz der etablierten Methodik für die Bestimmung des AAVal-Gehaltes einer einzelnen Probe wird durch sechsfache Messung einer aufgearbeiteten Blutprobe bestimmt (Genauigkeit). Ebenso wird die Varianz für die Bestimmung des GAAVal-Gehaltes ermittelt. Die ermittelten Variationskoeffizienten lassen eine Bewertung der Messunsicherheit des verwendeten GC/MS-Gerätes zu.

Um den Einfluss der Aufarbeitung auf die Varianz der Messwerte zu erfassen werden die AAVal- sowie GAAVal-Gehalte von sechs unabhängig voneinander aufgearbeiteten Proben eines Probanden und Blutentnahmezeitpunktes gemessen (Präzision).

Auf diese Weise wird eine vergleichende Bewertung der internen Kalibrierung mit den PFPTH-Standards und den Dipeptidstandards möglich.

4.3.2.8 Auswertung

Zur Berechnung der Hämoglobinaddukte von AA bzw. GA bezogen auf die eingewogene Menge Hämoglobin wird folgende Formel verwendet:

$$n(\text{Hämoglobinaddukt}) [\text{pmol}] = \frac{n(\text{Interner Standard}) [\text{pmol}] \times \text{Peakfläche (Analyt)} [\text{FE}]}{\text{Peakfläche (IntStd)} [\text{FE}]}$$

Die erhaltenen Stoffmenge werden mit folgender Formel auf 1 g Hämoglobin bezogen:

$$n(\text{Hämoglobinaddukt}) [\text{pmol/g Hb}] = \frac{n(\text{Hämoglobinaddukt}) [\text{pmol}] \times 1000}{\text{Hb - Einwaage} [\text{mg}]}$$

Bei der Verwendung der Dipeptidstandards zur internen Kalibrierung finden die oben aufgeführten Formeln Anwendung. Zusätzlich muss der Umsetzungsgrad des Dipeptidstandards mit Acrylamid bzw. Glycidamid (Reinheitsgrad) berücksichtigt werden. Dazu wird folgende Formel benutzt:

$$n(\text{Int. Std.}) = \frac{m(\text{Int. Std.}) \times \text{Reinheitsgrad} [\%]}{M(\text{Int. Std.})}$$

4.4 Ermittlung der *In vivo* Adduktbildung von Acrylamid und Glycidamid mit dem N-terminalen Valin des Hämoglobins im Rahmen der humanen Verzehrsstudie „Bedeutung der CYP 2E1-Aktivität für die Toxikokinetik von Acrylamid beim Menschen“

Im Rahmen einer Kooperationsarbeit mit der Universität zu Köln, Institut für Pharmakologie, wurden Blutproben hinsichtlich ihres Gehaltes an Hämoglobinaddukten von Acrylamid und Glycidamid untersucht. Die Proben wurden im Verlauf der Studie „A Phase I/IV, Open Label, 4-Way-Change-Over Pilot Study to Evaluate Toxicokinetics of Acrylamide and its Metabolite Glycidamide Following Ingestion of Acrylamide Containing Food and Acrylamide Containing Food in Combination with Alcohol in Sixteen Healthy Male and Female Volunteers“ (Study number: KPUK-03-ACR/PIL-01) generiert. Ziel dieser Studie ist die Gewinnung neuer Erkenntnisse zur Toxikokinetik von Acrylamid in Menschen unter besonderer Berücksichtigung der Rolle der CYP 2E1-Aktivität. Die in dieser Studie bestimmten Parameter wurden nach Acrylamidgabe ohne Comedikation, nach Acrylamidgabe in Gegenwart des CYP 2E1-Inhibitors Disulfiram und eine sich der Induktion von CYP 2E1 durch einwöchig täglich erfolgte Aufnahme von Ethanol anschließende Acrylamidgabe bestimmt. Die Studie umfasste folgende Parameter: der Status der CYP 2E1-Expression, die Mercaptursäuren AAMA und GAMA sowie freies Acrylamid im Urin. Zusätzlich dazu wurden im Rahmen dieser Arbeit die Hämoglobinaddukte von Acrylamid und Glycidamid quantifiziert. [Doroshenko *et al.*, 2008, Fuhr und Schömig, 2005]

4.4.1 Design der Studie

4.4.1.1 Studienperioden

Die Studie besteht aus vier Studienperioden, die den teilnehmenden Probanden als zufällig generierte Sequenz zugeordnet wurde („randomisiert“).

- **Phänotypisierung (P)**

In der Phänotypisierungsperiode erhielten die Probanden 250 mg Chlorzoxazone (oral; ½ Tablette der Stärke 500 mg Chlorzoxazone; Parafon forte® DSC). Die

Konzentrationen von Chlorzoxazon (CHZ) und seinem Metabolit 6-OH-CHZ im Plasma wurden vor Gabe (pre-dose) und zwei Stunden danach mit HPLC bestimmt. Bei der CYP 2E1-Genotypisierung wurden die häufigsten Varianten (Allele *5A, *5B, *6) mit RFLP-PCR untersucht.

- **Referenzperiode (R)**

In der Referenzperiode erhielten die Probanden eine 150 g Portion Kartoffelchips mit einem Gehalt von 1 mg (957-1000 µg \cong 14,8 µg/kg KG) Acrylamid.

- **Testperiode 1 (T1)**

In der Testperiode 1 erhielten die Probanden nach einer 10 Stunden zuvor erhaltenen oralen Dosis von 500 mg Disulfiram (Antabus® 0,5 Dispergetten) eine 150 g Portion Kartoffelchips, mit einem Gehalt von 1 mg (957-1000 µg \cong 14,8 µg/kg KG) Acrylamid.

- **Testperiode 2 (T2)**

In der Testperiode 2 erhielten die Probanden eine 150 g Portion Kartoffelchips, mit einem Gehalt von 1 mg (957-1000 µg \cong 14,8 µg/kg KG) Acrylamid, nach einwöchiger Vorbehandlung durch eine tägliche Aufnahme von 48 ml Ethanol in Form von zwei Flaschen Kölschbier (Reissdorf Kölsch®)

Die Wash-out Intervalle betrugen 2 Wochen zwischen den Gaben der acrylamidreichen Nahrung in Form von Kartoffelchips. [Fuhr und Schömig, 2005]

4.4.1.2 Probanden

An der Studie nahmen 16 gesunde kaukasische Probanden (8 männlich, 8 weiblich; 20-45 Jahre) teil. Es wurden umfangreiche klinische Voruntersuchungen durchgeführt [Fuhr und Schömig, 2005]. Die Untersuchung der Hämoglobinaddukte wurde aus Blutproben der Probanden 04, 07 und 10 durchgeführt. Die randomisierte Abfolge der Studienperioden war für diese Probanden wie in Tabelle 9 angegeben:

Tabelle 9: Randomisierte Abfolge der Studienperioden für die Probanden 04, 07 und 10

Proband	1. Periode	2. Periode	3. Periode	4. Periode
04	P	R	T1	T2
07	T2	T1	R	P
10	R	T1	T2	P

4.4.1.3 Behandlung der Blutproben

Die Blutproben wurden zu folgenden Zeitpunkten entnommen: pre-Dosis (3 Minuten vor Acrylamidgabe), 0:30, 1:00, 1:30, 2:00, 2:30, 3:00, 4:00, 5:00, 6:00, 7:00, 8:00, 10:00, 12:00, 16:00 und 24:00 Stunden nach Dosierung [Fuhr und Schömig, 2005]. Die Aufarbeitung der Proben bis zum Hämolysat wurde von Mitarbeitern der Universität zu Köln, Institut für Pharmakologie, gemäß der im Abschnitt 4.3.2.4 beschriebenen Vorschrift durchgeführt. Die Hämolysate wurden bei -80°C gelagert und unter Kühlung mittels Trockeneis verschickt. Alle weiteren Aufarbeitungsschritte erfolgten gemäß der unter Abschnitt 4.3.2.4 beschriebenen Vorschrift an der Technischen Universität Kaiserslautern, Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie.

4.5 Verteilung von ^{14}C -Acrylamid in humanem Vollblut

4.5.1 Geräte, Chemikalien und Materialien

Geräte

Gefrierschrank	-20 °C
Labor-Glasgeräte	diverse Duranglas
LSC	LS 1701 [Beckmann]
Pipetten	[Abimed]
Schüttelheizer	Thermomixer 5436 [Eppendorf]
Vortex	[Heidolph]
Zentrifuge	Centrifuge 5415 C [Eppendorf]

Chemikalien

[2,3- ^{14}C]-Acrylamid	5 mCi/mmol, 1 mCi/ml, gelöst in Ethanol; [American Radiolabeled Chemicals]
Ethanol	p.A. [Merck]
Protease	lyophilisiert 7.5 AU [Qiagen]
SDS	[Riedel de Haën]
Szintillationscocktail	Rotiszint eco plus [Roth]
Wasser	bidestillert

Verbrauchsmaterialien

Kanülen zur Blutabnahme	Multifly [®] -Set [Sarstedt]
Monovetten	mit EDTA [Sarstedt]
Pipettenspitzen	verschiedene Größen [Greiner Bio-One GmbH]
Reaktionsgefäße	2 ml [Greiner Bio-One GmbH]
Vials für LSC	Polyvials V 20 ml [Zinsser Analytik]

4.5.2 Durchführung

4.5.2.1 Gewinnung des Humanblutes

Den Probanden wurde im Sitzen nach proximaler Stauung und Palpation der Armvene, sowie Desinfektion der Einstichstelle, über eine Multifly-Kanüle die benötigte Menge Blut in EDTA-Monovetten (9 ml) abgenommen. Das Blut in den EDTA-Monovetten wurde sofort wie folgend beschrieben weiter aufgearbeitet.

4.5.2.2 Herstellung der ^{14}C -AA-Inkubationslösungen

Zur Herstellung der Inkubationslösungen wird die [2,3- ^{14}C]-Acrylamid-Stammlösung mit Ethanol so verdünnt, dass durch Zugabe von 5 μl der verdünnten Lösung zu 1,5 ml Vollblut eine Acrylamid-Konzentration von 3 und 30 μM (entsprechend 22,5 und 225 nCi) resultiert.

Die Konzentrationen der ^{14}C -AA-Lösungen sind so gewählt, dass eine Vermessung der Proben mit dem Flüssig-Szintillationszähler mit ausreichender Signalintensität möglich ist und die Freigrenze für das Arbeiten mit ^{14}C -markierten Substanzen nicht überschritten wird. Die Inkubationsbedingungen sind desweiteren an jene der Dosimetrieversuche angelehnt.

4.5.2.3 Inkubation der humanen Blutproben

Das Vollblut wird in Aliquots von 1,5 ml Vollblut in Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert. Alle Versuche werden als Vierfachbestimmung durchgeführt. Es werden 5 μl der entsprechenden ^{14}C -AA-Inkubationslösungen zupipettiert. Die Blutproben werden zum Erreichen einer gleichmäßigen Verteilung des Acrylamids in der Probe vorsichtig gewendet. Verwendet werden die ^{14}C -AA-Konzentrationen 0,3, 3 und 30 μM sowie die Inkubationszeiten 15 min, 1 h, 4 h und 6h. Die Inkubation findet unter leichtem Schütteln (Stufe 6) in einem Schüttelwasserbad bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C statt.

Es wird zusätzlich zu den inkubierten Proben eine Blindprobe mitgeführt, die sich aus 1,5 ml Vollblut und 5 μl Ethanol zusammensetzt. Zur Kontrolle der verwendeten Gesamtradioaktivität pro inkubierter Probe wird außerdem 1,5 ml Vollblut mit der entsprechenden Menge an Radioaktivität versetzt, jedoch nicht fraktioniert.

Tabelle 10: Beschreibung der humanen Blutproben und der Bedingungen für die Inkubation mit ^{14}C -Acrylamid

Nummer (je ein Proband)	Messwerte je Fraktion (n)	^{14}C -AA-Konz.	Inkubationsdauer	Auftrennung der Erythrozytenfraktion
R 22, R 27	8	3 μM	15 min	nein
R 21	4	30 μM	15 min	nein
R 19	4	3 μM	1 h	nein
R 13, R 14, R 17	12	30 μM	1 h	nein
R 12, R 18	8	3 μM	4 h	nein
R 15, R 16	8	30 μM	4 h	nein
R 30, R 31, R 32	12	30 μM	4 h	ja
R 23	4	3 μM	6 h	nein
R 20	4	30 μM	6 h	nein

4.5.2.4 Gewinnung der Blutfraktionen

Alle Aufarbeitungsschritte finden in Eppendorf-Reaktionsgefäßen statt, deren Leergewicht zuvor bestimmt wurde, so dass eine gravimetrische Bestimmung der einzelnen Blutfraktionen zu verschiedenen Zeitpunkten der Aufarbeitung durchgeführt werden kann.

Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Vollblutproben für 10 Minuten mit 100 g (1200 rpm) zur Trennung von der Erythrozyten-Fraktion und der Plasma-Fraktion zentrifugiert.

Variante ohne weitere Aufarbeitung der Erythrozytenfraktion

Die Erythrozyten werden mit 500 μl 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung gewaschen und für 10 Minuten mit 100 g zentrifugiert. Die gewonnene Waschlösung bildet eine eigene Fraktion. Die Lyse der Erythrozyten erfolgt durch Zugabe von 500 μl bidestilliertem Wasser und 100 μl SDS-Lösung unter Verwendung des Vortex.

Das Plasma wird für 10 Minuten mit 700 g (3000 rpm) zur Gewinnung der Thrombozyten zentrifugiert und das überstehende Plasma wird separiert. Die zurückbleibende Thrombozytenfraktion wird mit 700 μl bidest. Wasser und 250 μl

SDS-Lsg. versetzt. Es werden 100 µl des Plasmas aliquotiert und die darin enthaltenen Plasmaproteine mit 400 µl eiskaltem Aceton ausgefällt. Zur Abtrennung der Plasmaproteine werden die Proben für 4 Minuten mit 100 g zentrifugiert. Das ausgefällte Protein wird mit weiteren 200 µl eiskaltem Aceton gewaschen. Die Acetonphasen werden vereinigt. Das Protein wird in 400 µl 0,9%iger NaCl-Lösung mit Unterstützung des Vortex suspendiert.

Die unfractionierte inkubierte Vollblutprobe wird durch Zugabe von 300 µl bidest. Wasser und 100 µl SDS-Lösung lysiert.

Variante mit Fraktionierung der Erythrozytenfraktion

Die Erythrozyten werden mit 500 µl 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung gewaschen und für 10 Minuten mit 100 g zentrifugiert. Die gewonnene Waschlösung bildet eine eigene Fraktion. Die Lyse der Erythrozyten erfolgt durch Zugabe von 100 µl bidestilliertem Wasser und Einfrieren für 30 Minuten. Nach dem Auftauen der Fraktionen werden diese mit dem Vortex behandelt. Von dem erhaltenen Lysat werden 100 µl aliquotiert. Durch Zugabe von 700 µl 50 mM HCl in 2-Propanol, Vortex-Behandlung und Zentrifugation bei 3500 g (5000 rpm) für 10 Minuten wird das Hämoglobin extrahiert. Aus dem separierten, das Erythrozyten-Zytosol enthaltenden Überstand wird das Hämoglobin durch Zugabe von 700 µl Ethylacetat und Lagerung bei -18°C für 15 Minuten ausgefällt. Es wird bei 3500 g (5000 rpm) für 5 Minuten zentrifugiert. Das abgetrennte Hämoglobin wird mit 100 µl Ethylacetat gewaschen. Die Ethylacetatphasen werden vereinigt. Das Hämoglobin sowie die Erythrozytenfragmente werden mit 500 µl 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung und 40 µl der Proteaselösung versetzt, mit dem Vortex behandelt und für 2 Stunden bei 37°C im Thermomixer geschüttelt (Stufe 12).

Nach Abbruch der Inkubation wird die Plasmafraktion zunächst tiefgefroren, damit während der Erythrozytenaufarbeitung keine weitere Reaktion des ¹⁴C-Acrylamids in dieser Fraktion stattfinden kann. Nach Auftauen der Plasmafraktion wird ein Aliquot von 100 µl entnommen und die darin enthaltenen Plasmaproteine mit 400 µl eiskaltem Aceton ausgefällt. Zur Abtrennung der Plasmaproteine werden die Proben für 4 Minuten mit 100 g zentrifugiert. Das ausgefällte Protein wird mit weiteren 200 µl eiskaltem Aceton gewaschen. Die Acetonphasen werden vereinigt. Das Protein wird in 400 µl 0,9%iger NaCl-Lösung und 10 µl Proteaselösung mit Unterstützung des

Vortex suspendiert. Die Fraktion wird 2 Stunden bei 37°C im Thermomixer geschüttelt (Stufe 12).

4.5.2.5 *Messung der Blutfraktionen*

Die Proben, die aus der Aufarbeitungsvariante ohne Fraktionierung der Erythrozyten resultieren, werden in unterschiedlichen Volumina der Messung im LSC zugeführt. Von den Fraktionen der Erythrozyten, der Erythrozytenwaschlösung, des Plasmas, des proteinfreien Plasmas sowie des unaufgearbeiteten Vollbluts werden je 100 µl, von der Proteinfraction (400 µl) wird die vollständige Fraktion in die LSC-Messvials überführt. Es werden je 10 ml des Szintillationscocktails zugegeben und die Messlösungen unmittelbar vor der Messung kräftig geschüttelt.

Von den Proben, die aus der Aufarbeitungsvariante mit Fraktionierung der Erythrozyten resultieren, werden je 100 µl in die LSC-Messvials überführt und mit je 10 ml des Szintillationscocktails versetzt. Die Messlösungen werden ebenfalls unmittelbar vor der Messung kräftig geschüttelt.

4.5.2.6 *Bestimmung der Quenchung der Blutfraktionen*

Die Quenchung des LSC-Messsignals wird für alle Blutfraktionen bestimmt, um den Einfluss der jeweiligen Eigenfärbung zu untersuchen. Dazu wird nicht-inkubiertes Vollblut wie beschrieben aufgearbeitet. In je 300 µl der erhaltenen Fraktionen wird eine ^{14}C -AA-Konzentration von 3 µM erzeugt. Der Vergleich mit Messungen von Wasserproben mit entsprechender ^{14}C -AA-Konzentration ermöglicht eine Bestimmung der matrixspezifischen Erniedrigung des Messsignals. Aufgrund der geschlechtsspezifischen Unterschiede in den Mengenverhältnissen von Erythrozyten und Plasma wird die Quenchung von den Blutfraktionen eines männlichen und eines weiblichen Probanden ermittelt. Bei den Proben, die nach der Variante ohne Fraktionierung der Erythrozytenfraktion aufgearbeitet werden, werden diese Quenchfaktoren bei der Auswertung für alle Fraktionen berücksichtigt. Bei den Proben, die nach der Variante mit Fraktionierung der Erythrozytenfraktion aufgearbeitet werden, sind für die Blutproben der Probanden spenderspezifische Quenchfaktoren bestimmt worden. Es finden die Quenchfaktoren für die Fraktion der Erythrozyten, der Erythrozytenfragmente sowie des Hämoglobins Berücksichtigung, da experimentell gezeigt werden konnte, dass nur diese Fraktionen eine das Messsignal deutlich beeinflussende Eigenfärbung aufweisen.

4.5.2.7 Auswertung

Von den erhaltenen LSC-Messwerten für jede Fraktion werden die entsprechenden Messwerte der Blindproben abgezogen. Unter Einbeziehung der während der Fraktionierung gewonnenen gravimetrischen Daten für die entnommenen Aliquots sowie den für die LSC-Messung entnommenen Aliquots werden Faktoren errechnet, die den Massenanteil der Aliquots an der Gesamtblutprobe berücksichtigen. Durch Multiplikation der so abgeleiteten Faktoren mit den um die Blindwerte korrigierten LSC-Messwerten werden die Gesamtaktivitäten für die Fraktionen berechnet, so dass eine prozentuale Verteilung des ^{14}C -Acrylamids in den Blutkompartimenten resultiert. Darüber hinaus wird die bei den stark gefärbten Fraktionen auftretende Quenchung des LSC-Signals berücksichtigt.

4.6 Statistische Auswertungen

Die Ergebnisse wurden gemittelt und als solche dargestellt. Bei zwei unabhängigen Versuchen wurde der Standardfehler (\pm SE), bei $n > 2$ die Standardabweichung als Fehler angegeben.

4.6.1 Signifikanzen

Zur Bestimmung einer statistischen Signifikanz bei der Auswertung der Hämoglobinaddukte sowie der Verteilung von ^{14}C -Acrylamid im Humanblut wurde der ungepaarte Student-t-Test (2 Populationen) angewendet. Als signifikant wurden Irrtumswahrscheinlichkeiten von $p < 0,05$, $p < 0,01$ und $p < 0,001$ angenommen. Die Signifikanzen wurden der Tabelle für die t-Verteilung entnommen [Gottwald, 2000].

4.6.2 Ausreißer-Test

Zur Überprüfung, ob ein Wert aufgrund seiner hohen Abweichung aus der Mittelwertbildung entnommen werden kann, wurde der Ausreißertest nach NALIMOV durchgeführt. Grundvoraussetzung für die Anwendbarkeit des Testes ist das Vorliegen von mindestens drei Werten. Die Kontrolle erfolgt auf den kleinsten und größten Wert. Die Prüfgröße PG wird nach untenstehender Formel errechnet und mit

dem Tabellenwert für die entsprechende Stichprobenzahl verglichen. Für den Fall, dass der Prüfwert kleiner als der Tabellenwert ist, liegt nach NALIMOV kein Ausreißer vor. [Gottwald, 2000]

$$PG = \frac{|x^* - MW|}{s_x} \times \sqrt{\frac{N}{N-1}}$$

x^* = ausreißerverdächtiger Wert

MW = Mittelwert

s_x = Standardabweichung

N = Anzahl der Stichproben

4.6.3 Statistische Auswertung der Hb-Addukte im Rahmen der Humanverzehrstudie

4.6.3.1 Auswertung der pre- und 24 h-Werte

Zur Bewertung der Daten aus der Humanverzehrstudie wurden weitere statistische Auswertungen mit Hilfe der Software „R®“ durchgeführt.

Für die Anfangs- und Endzeitpunkte der Studienphasen R, T1 und T2 wurde auf eine Normalverteilung der Messwerte geprüft. Aufgrund der teilweise geringen Anzahl der Messwerte für einzelne Datenpunkte fanden die Tests nach Lilliefors (Kolmogorov-Smirnow) sowie nach Shapiro-Francia Anwendung.

Es wurde eine ANOVA-Varianzanalyse der Ausgangs- und Endwerte durchgeführt. Zur Generierung eines gleichen Ausgangsniveaus der Werte wurde von den Einzelwerten jeweils der pre-Mittelwert abgezogen. Als Faktoren wurden die Analyten (AA-Val, Ga-Val), die Probanden (04, 07 und 10), die Messzeitpunkte (pre, 24h) und die Studienphasen (R, T1 und T2) abgeleitet.

4.6.3.2 Auswertung des Kurvenverlaufs

Um eine mögliche Beeinflussung der statistischen Auswertung durch möglicherweise abweichende Werte an den Anfangs- und Endzeitpunkten auszuschließen, wurden weitere statistische Berechnungen unter Berücksichtigung der Gesamtheit der Messzeitpunkte durchgeführt.

Zur mathematischen Beschreibung des zeitlichen Verlaufs der Adduktbildung von Acrylamid mit dem N-terminalen Valin des Hämoglobins wurde das Gompertz-Modell gewählt, das den sigmoiden Verlauf der Adduktbildungskurve gut widerspiegelt. Dieses Modell setzt eine Normalverteilung der Messwerte und eine vollständige Erfassung der Steigung innerhalb des gemessenen Zeitraumes voraus. Aus den mit dem Gompertz-Modell errechneten Kurven lassen sich die Konfidenzintervalle für die individuellen Versuchsperioden der Probanden ableiten.

Die Formel für das Gompertz-Modell wird durch Integration der Wachstumsrate $d\omega/dt = k \omega \log(\alpha/\omega)$ zu

$$\omega = \alpha \cdot \exp\{-\beta \cdot e^{-k \cdot t}\}$$

erhalten.

Die Testung der Algorithmen erfolgt mit Schätzwerten für die Parameter α , β und k ($\alpha = 20$, $\beta = 0,5$ und $k = 0,2$). Eine Bedingung zur Erfassung von Unterschieden zwischen den pre- und 24h-Konfidenz-Intervallen ist, dass $k - 2 \times \text{Standardfehler} > 0$ sein muss.

Die Residuen (Fehlerterme) α^{\wedge} , β^{\wedge} und k^{\wedge} wurden auf ihre symmetrischen Eigenschaften hin untersucht, um die Richtigkeit des Modells zu bestätigen. Als Maß für „Goodness-of-fits“ wurde die folgende Gleichung verwendet:

$$\frac{SS_{\text{reg}}}{TSS} = \frac{\sum (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum (y_i - \bar{y})^2}$$

mit SS_{reg} : sum of squares due to regression, TSS: total sum of squares, y : Daten, \hat{y} : Schätzwerte

Wenn für t Normalität vorausgesetzt wird, ergeben sich für das 97,5% Quantil ein Faktor von $\cong 2$ und für das 99,5% Quantil ein Faktor von $\cong 2,6$. Diese Faktoren werden für die Berechnung der Minimal- und Maximalwerte der Parameter α , β und k verwendet. Dazu werden die 2- bis 2,6-fachen Standardfehler vom jeweiligen Zahlenwert des Parameters subtrahiert bzw. zu dem Zahlenwert des Parameters addiert. Für das 95 %- und das 99 %-Konfidenzintervall werden die Minimal- und Maximalwerte für die Zeitpunkte $t = 0$ h (pre) und $t = 24$ h berechnet.

4.7 Sonstige Berechnungen

4.7.1 Berechnung der *in vivo* Dosis

$$D_{\text{in vivo}} [\mu\text{M} \times \text{h}] = \frac{\text{Hb - Adduktlevel} [\text{pmol/ g Hb}]}{1/2 \text{ Erythrozytenlebensdauer} [\text{d}] \times k_{\text{AAVal}} [\text{L}/(\text{g Hb} \times \text{h})]}$$

mit Erythrozytenlebensdauer: 120 [d] und k_{AAVal} : 4,4 [L/g Hb × h]

[Bergmark, 1997, Osterman-Golkar und Ehrenberg, 1983]

4.7.2 Substanzaufnahme berechnet aus der *in vivo* Dosis

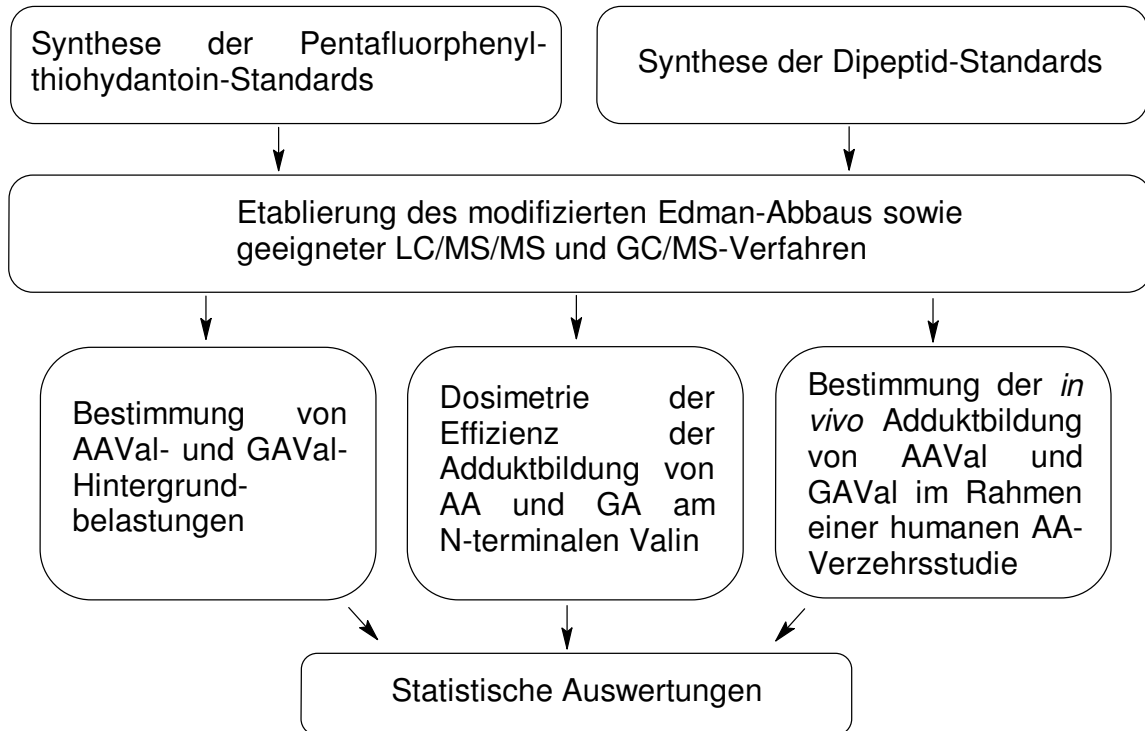
$$\text{Aufnahme} [\mu\text{g}/(\text{kg} \times \text{d})] = D_{\text{in vivo}} [\mu\text{M} \times \text{h}] \times \text{Elimination} [\text{h}^{-1}] \times \text{Molmasse} [\text{g/mol}] \times 1/(\text{L/kg})$$

mit Elimination: 0,1 [h⁻¹] und Molmasse (Acrylamid): 71 [g/mol]

[Bergmark, 1997, Osterman-Golkar und Ehrenberg, 1983]

5 Ergebnisse und erste Diskussion

Untersuchung der Adduktbildung am N-terminalen Valin des Hämoglobins



Untersuchung der Verteilung von ^{14}C -Acrylamid im humanen Vollblut

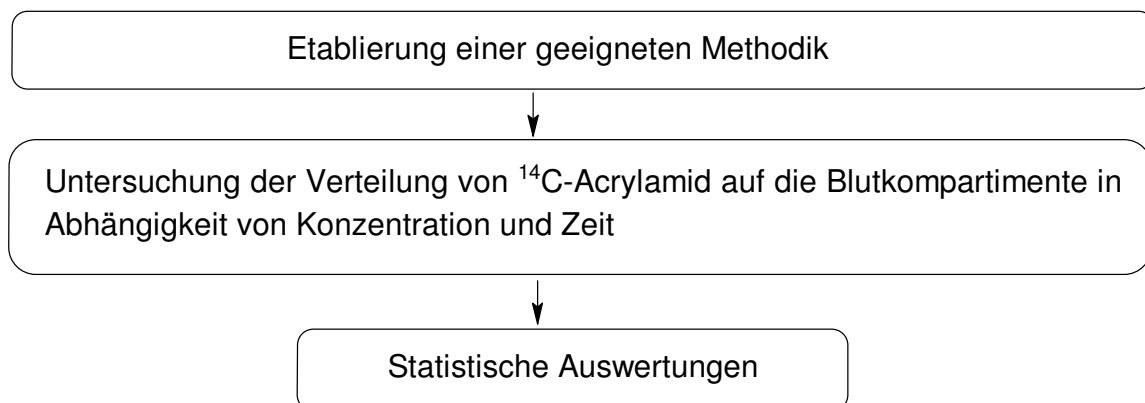


Abbildung 17: Übersichtsschema der durchgeführten Arbeiten

5.1 Synthese der Pentafluorphenylthiohydantoin-Derivate zur Standardisierung

Zur Etablierung eines analytischen Verfahrens zur Quantifizierung der Hämoglobinaddukte von Acrylamid und Glycidamid wurden Pentafluorphenylthiohydantoin-Derivate als Referenzsubstanzen synthetisiert. Die Darstellung erfolgte in Anlehnung an die Literatur [Bergmark *et al.*, 1993, Rydberg *et al.*, 1993]. NMR-spektroskopische Daten der Vorstufen sowie der nicht isotopenmarkierten Produkte befinden sich im Anhang.

5.1.1 Synthese von AAd₇Val-PFPTH (1-(2-Aminocarbonylethyl)-(S)-5-d₇-isopropyl-3-pentafluorphenyl-2-thiohydantoin)

Zur Herstellung von AAd₈Val wurden L-d₈Valin und Acrylamid bei pH 10 im wässrigen Milieu umgesetzt. Aus dem resultierenden AAd₈Val wird in einem Gemisch aus wässriger NaHCO₃-Lösung und 1-Propanol durch Reaktion mit Pentafluorphenylisothiocyanat das Thiohydantoin-Derivat AAd₇Val-PFPTH erhalten (Abbildung 18).

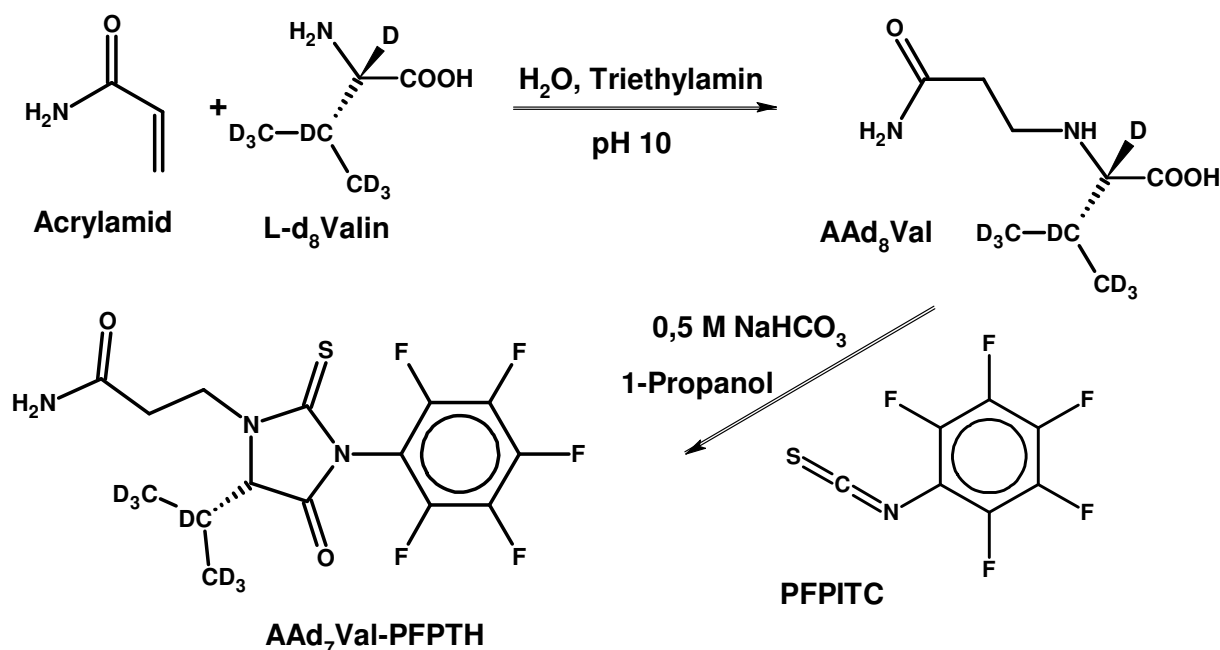


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Synthese von AAd₇Val-PFPTH

Charakterisierung mittels ^1H -NMR:

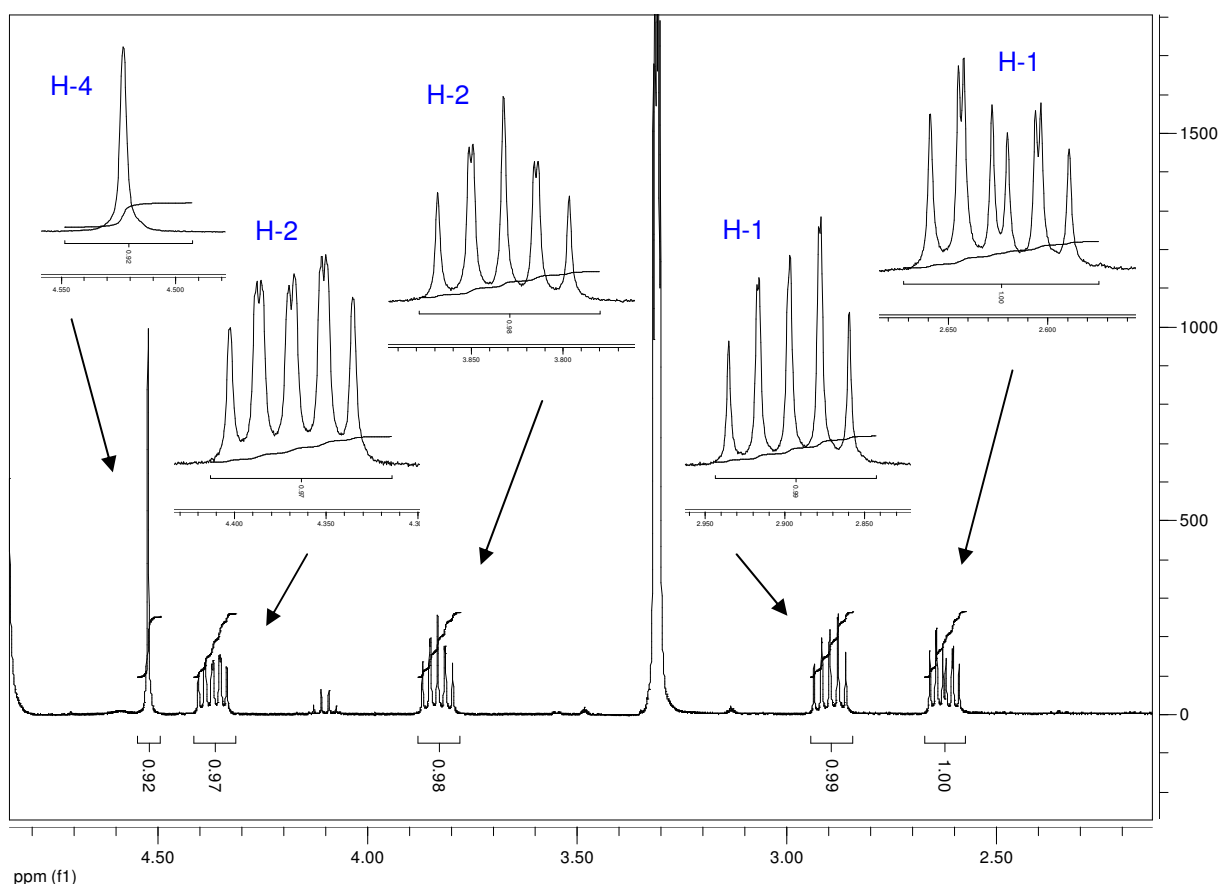
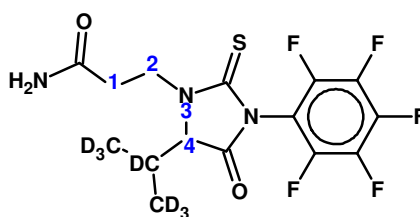


Abbildung 19: Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum von AAd₇Val-PFPTH (400.13 MHz, d₄-Methanol, δ in ppm, 298 K) von 2.2-4.8 ppm

Tabelle 11: Zuordnung der Protonen im ^1H -NMR-Spektrum von AAd₇Val-PFPTH

δ [ppm]	Charakterisierung
2,59-2,66	m, 1 H, H-1
2,86-2,94	m, 1 H, H-1
3,80-3,87	m, 1 H, H-2
4,34-4,40	m, 1 H, H-2
4,52	s, 1 H, H-4



In Abbildung 19 ist der relevante Ausschnitt des ^1H -NMR-Spektrums gezeigt. Für die Isopropylgruppe sind keine Signale detektierbar, da sie deuteriert vorliegt. Die diastereotopen Protonen des Aminocarbonyl-ethyl-Substituenten werden als Multipletts bei ca. 2,59-2,66 ppm und 2,86-2,94 ppm (H-1) sowie bei ca. 3,80-3,87 ppm (H-2) detektiert. Das Proton H-4 liegt nicht deuteriert vor, bedingt durch den in der Literatur beschriebenen Reaktionsmechanismus der Ringbildung zwischen

AAd₈Val und PFPITC [Bergmark, 1997, Rydberg *et al.*, 2002]. H-4 tritt bei 4,52 ppm als Singulett in Resonanz.

GC/MS (neg. Cl): 382,2 m/z ([M-HF]⁻)

Ausbeute: 19,4 mg (9,5 %; 0,048 mmol); weißer Feststoff

5.1.2 GAd₇Val-PFPTH

Analog zu 5.1.1 wurde zunächst GAd₈Val aus L-d₈Valin und Glycidamid bei pH 10 im wässrigen Milieu synthetisiert. Aus GAd₈Val wird in einem Gemisch aus wässriger NaHCO₃-Lösung und 1-Propanol durch Reaktion mit Pentafluorphenylisothiocyanat das Thiohydantoin-Derivat GAd₇Val-PFPTH erhalten.

Charakterisierung mittels ¹H-NMR:

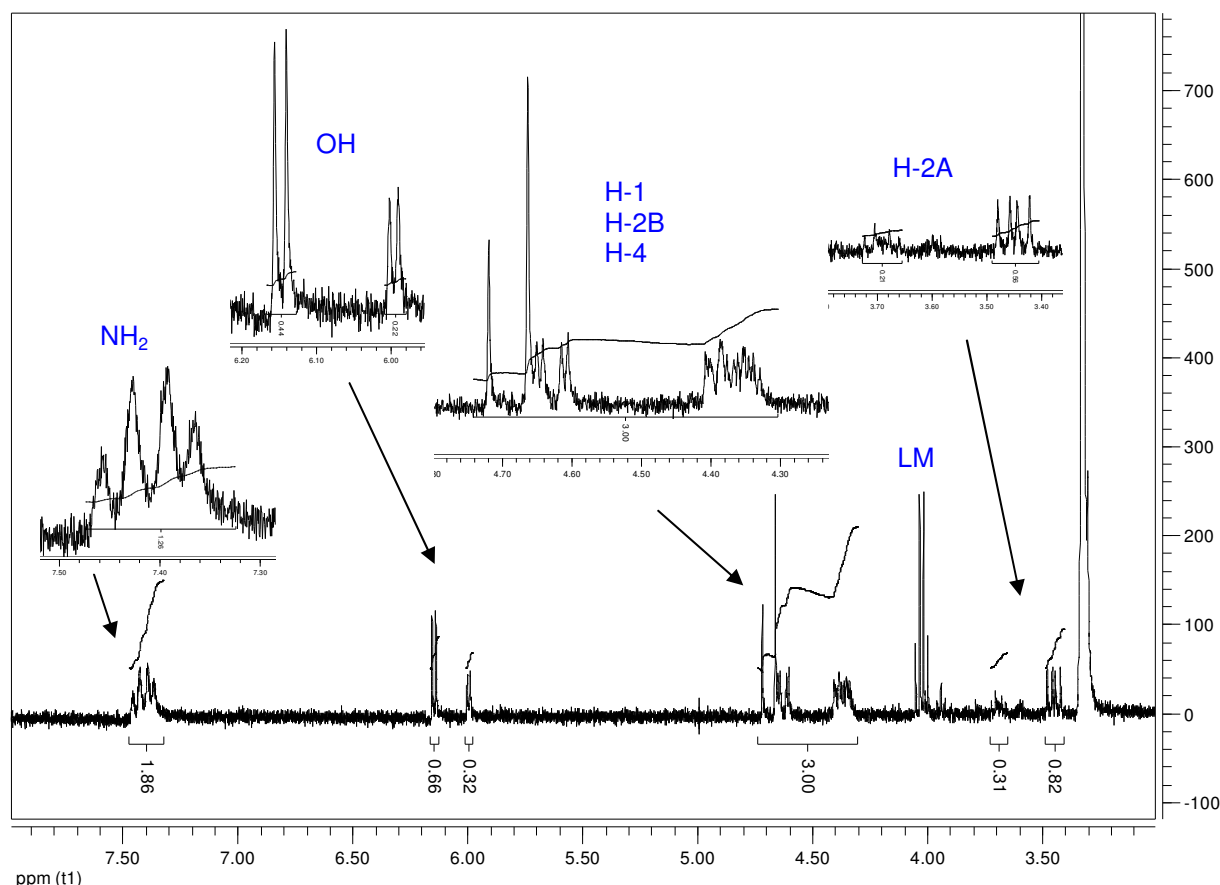
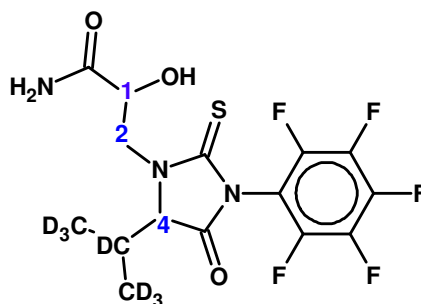


Abbildung 20: Ausschnitt aus dem ¹H-NMR-Spektrum von GAd₇Val-PFPTH (400.13 MHz, d₄-Methanol, δ in ppm, 298 K) von 3.0-7.9 ppm

Tabelle 12: Zuordnung der Protonen im ^1H -NMR-Spektrum von $\text{GAd}_7\text{Val-PFPth}$

δ [ppm]	Charakterisierung
3,42-3,72	m, 1 H, H-2A
4,33-4,72	m, 3 H, H-1, H-2B, H-4
5,99-6,16	dd, 1 H, OH
7,37-7,46	m, 2 H, NH₂



In Abbildung 20 ist der relevante Ausschnitt des ^1H -NMR-Spektrums gezeigt. Für die Isopropylgruppe sind keine Signale detektierbar, da sie deuteriert vorliegt. Die Protonen des Aminocarbonyl-hydroxyethyl-Substituenten werden als Multipletts bei ca. 4,33-4,41 ppm (H-1) sowie bei ca. 3,42-4,05 ppm (H-2) detektiert. Das Proton H-4 liegt nicht deuteriert vor, bedingt durch den in der Literatur beschriebenen Reaktionsmechanismus der Ringbildung zwischen GAd_8Val und PFPITC [Bergmark, 1997, Rydberg *et al.*, 2002]. H-4 tritt bei 4,61-4,72 ppm in Resonanz. Die OH-Gruppe des Aminocarbonyl-hydroxyethyl-Substituenten tritt bei 5,99-6,16 ppm in Resonanz und ist zweimal im Spektrum vorhanden. Der bei GC/MS-Messungen auftretende Doppelpeak für $\text{GA(d}_7\text{)Val-PFPth}$ (N-(R,S)-(2-Aminocarbonyl-2-hydroxyethyl)-valin-pentafluorphenylthiohydantoin) sowie für die entsprechende acetonisierte Form wird in der Literatur als Diastereomerenpaar beschrieben, auf Grund der zwei im Molekül vorhandenen optisch aktiven Zentren [Doerge *et al.*, 2005b, Fennell *et al.*, 2006, Perez *et al.*, 1999, Schettgen *et al.*, 2004b, Tornqvist *et al.*, 2002]. Die jeweils 2 Signale für die OH-Gruppe und die im ungefähr gleichen Verhältnis vorliegenden Signale für H-4 entstehen durch den partiellen Doppelbindungscharakter der CO-NH-Bindung. Der Reaktionsmechanismus ist in der Abbildung 21 dargestellt.

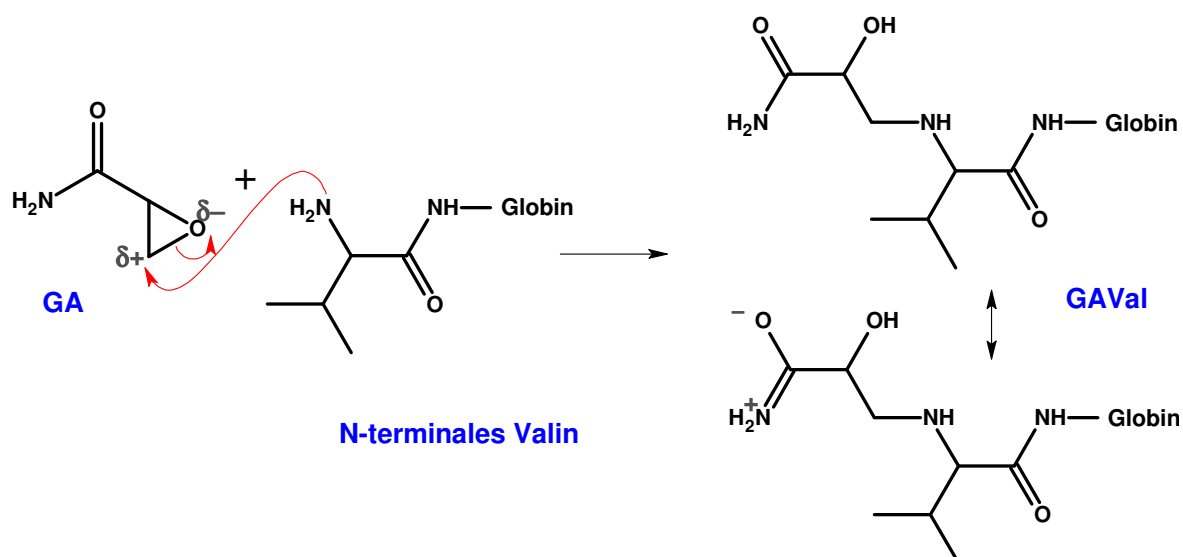


Abbildung 21: Reaktionsmechanismus der Adduktbildung von Glycidamid mit dem N-terminalen Valin des Hämoglobins unter Bildung von GAVal (N-(2-Aminocarbonyl-2-hydroxyethyl)-Valin-Addukt)

Ausbeute: 150,0 mg (48,8 %; 0,73 mmol); hygroskopischer weißer Feststoff

5.1.3 acGAd₇Val-PFPTH

Da acGAd₇Val-PFPTH der Analyt für die Quantifizierung der GAVal-Adduktbildung mittels GC/MS ist, muss dieses Thiohydantoinderivat für die analytische Methodenentwicklung synthetisiert werden. Bei der sog. Acetonisierung wird die im Molekül von GAd₇Val-PFPTH vorhandene Hydroxylgruppe durch säurekatalysierte Umsetzung mit Aceton in ein 2,2-Dimethyloxazolidinon überführt.

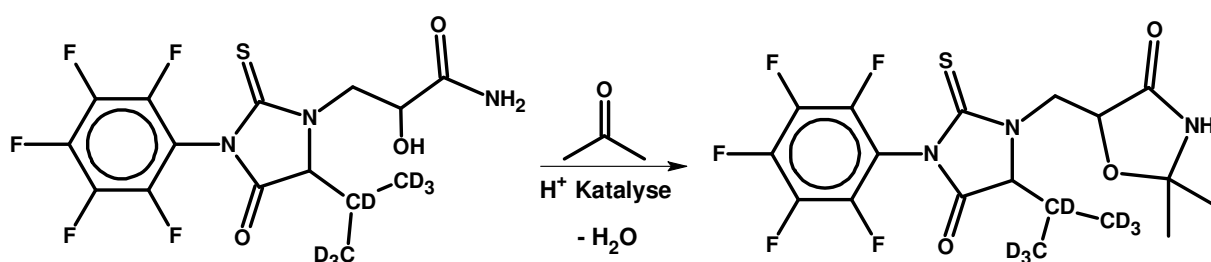


Abbildung 22: Schematische Darstellung der Synthese von acGAd₇Val-PFPTH (1-(2-Aminocarbonyl-2-hydroxyethyl)-(S)-5-d₇-isopropyl-3-pentafluorphenyl-2-thiohydantoin) säurekatalysiert durch 1% H₂SO₄

Das Produkt acGAd₇Val-PFPTH liegt zu 82,25 % in der acetonisierten Form und zu 17,75 % in der noch nicht acetonisierten Ausgangsform GAd₇Val-PFPTH vor (analysiert mit GC/MS). Diese Zusammensetzung wurde bei der Einwaage berücksichtigt. Die Signale im ¹H-NMR-Spektrum von acGAd₇Val-PFPTH erlauben

keine eindeutige Zuordnung. Auf eine Darstellung des Spektrums wurde deshalb verzichtet. Die Komplexität des Spektrums basiert auf den zusätzlichen Signalen des nicht acetonisierten GAd₇Val-PFPTH und der gehinderten Rotation der jeweils vorliegenden Amidstruktur. Sowohl acGAd₇Val-PFPTH als auch GAd₇Val-PFPTH liegen jeweils in Form der beiden Diastereomere vor.

GC/MS (neg. Cl): 438,2 m/z ([M-HF]⁻)

Ausbeute: 11,1 mg (20,7 %; 0,025 mmol); weißer Feststoff

5.2 *Synthese der Dipeptidderivate zur Standardisierung*

Um die Effizienz der Derivatisierung von AAVal und GAVal zu erfassen, ist die Verwendung von PFPTH-Standardsubstanzen nicht geeignet. Daher sollte um die Effizienz der Derivatisierung zu PFPTH-Derivaten analytisch miterfassen zu können, die Verwendung von Dipeptid-Standardsubstanzen erfolgen, die ebenfalls den Derivatisierungsschritt durchlaufen. Die Synthese der Dipeptid-Standardsubstanzen erfolgte auf zwei verschiedenen Syntheserouten. Bei der ersten Variante wurde zunächst die Aminogruppe von deuteriertem Valin BOC-geschützt, anschließend mit Leucin-p-nitroanilid gekoppelt und das Dipeptid nach Abspaltung der BOC-Schutzgruppe mit Acrylamid bzw. Glycidamid umgesetzt. Die Ergebnisse dieser Variante sind im Folgenden dargestellt. Es wurden verschiedene Möglichkeiten getestet, ideale Bedingungen für die Umsetzung des Dipeptids mit Acrylamid und Glycidamid zu finden.

Eine weitere Syntheseroute, bei der zunächst Valin mit Acrylamid bzw. Glycidamid umgesetzt und anschließend mit Leucin-p-nitroanilid gekoppelt wurde, führte nicht zu dem gewünschten Erfolg, da eine Isolierung des Produktes aus dem jeweiligen Reaktionsgemisch nicht möglich war.

5.2.1 d₈Valyl-leucin-p-nitroanilid

Das BOC-geschützte d₈Valin wird mit Hilfe des Kopplungsreagenzes Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) in einen aktivierten Ester umgewandelt. Das vorhandene 1-Hydroxybenzotriazol (1-HOBt) ersetzt das DCC unter Bildung einer racemisierungs-stabileren Intermediates. Die modifizierte Aminosäure L-Leucin-p-nitroanilid greift den HOBt-Ester ohne Racemisierung an und bildet dabei das Dipeptid BOC-L-d₈Valyl-L-leucin-p-nitroanilid. Die BOC-Schutzgruppe wird

anschließend im sauren pH-Bereich entfernt und als Produkt L-d₈Valyl-L-leucin-p-nitroanilid erhalten (Abbildung 23).

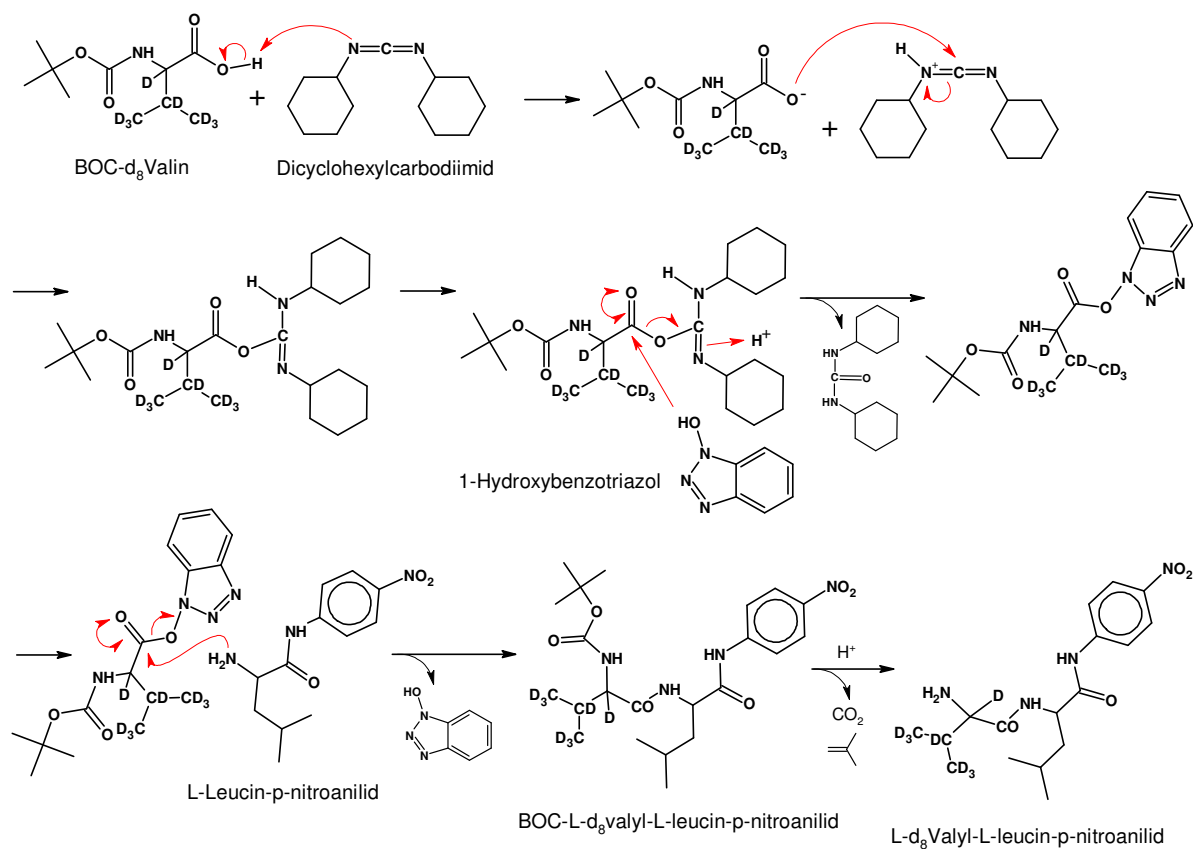


Abbildung 23: Schema zur Synthese von L-d₈Valyl-L-leucin-p-nitroanilid

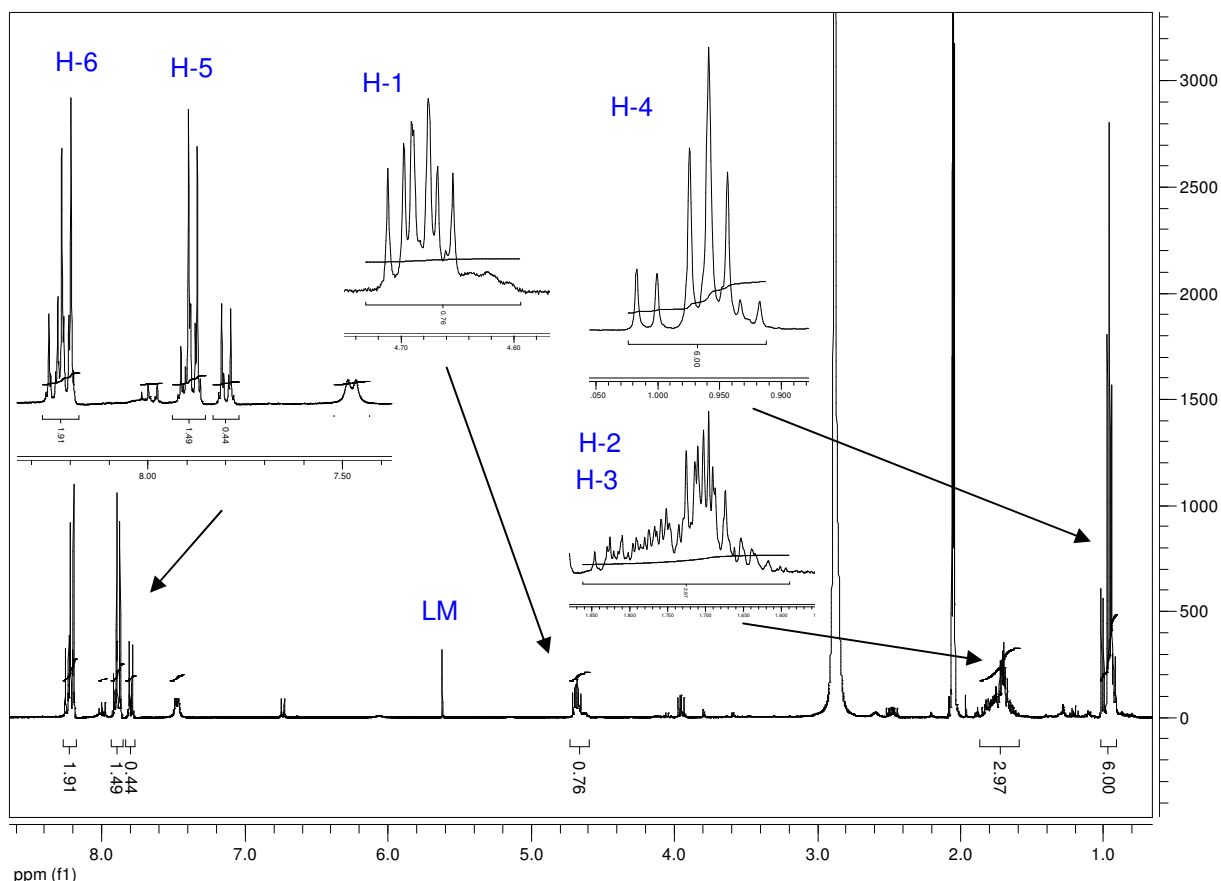
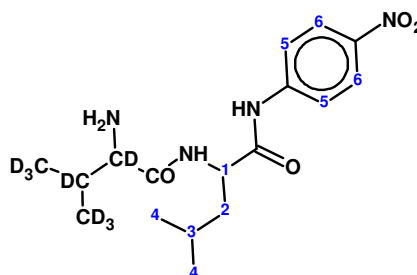


Abbildung 24: Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum von $\text{d}_8\text{Valyl-leucin-p-nitroanilid}$ (400.13 MHz, $\text{d}_4\text{-Methanol}$, δ in ppm, 298 K) von 1.9-8.3 ppm

Tabelle 13: Zuordnung der Protonen im ^1H -NMR-Spektrum von $\text{d}_8\text{Valyl-leucin-p-nitroanilid}$

δ [ppm]	Charakterisierung
0,92-1,02	m, 6 H, H-4
1,59-1,85	m, 3 H, H-2, H-3
4,65-4,71	m, 1 H, H-1
7,79-8,26	m, 4 H, H-5, H-6



In Abbildung 24 ist der relevante Ausschnitt des ^1H -NMR-Spektrums gezeigt. Die Isopropylgruppe des d_8Valyl -Restes liefert auf Grund ihrer Deuterierung keine Signale. Die vier Protonen des Nitrophenyl-Substituenten werden als Multipletts bei ca. 7,79-8,26 ppm (H-5, H-6) detektiert. Die verbleibenden Protonen sind dem Leucin-Rest zuzuordnen. Bedingt durch den partiellen Doppelbindungscharakter der Amid-Strukturen treten die Signale von H5/H6 und H1 bis H4 mehrfach und in unterschiedlichen Intensitäten auf. Die Reinheit ist ausreichend für eine weitere Umsetzung mit Acrylamid bzw. Glycidamid.

Ausbeute: 901,2 mg (93,7 %; 2,51 mmol); intensiv gelber Feststoff

5.2.2 AAd₈Valyl-leucin-p-nitroanilid

L-d₈Valyl-L-leucin-p-nitroanilid wurde in leicht alkalischer wässrig-methanolischer Lösung mit einer äquimolaren Menge Acrylamid zu dem alkylierten Dipeptid L-d₈Valyl-L-leucin-p-nitroanilid umgesetzt.

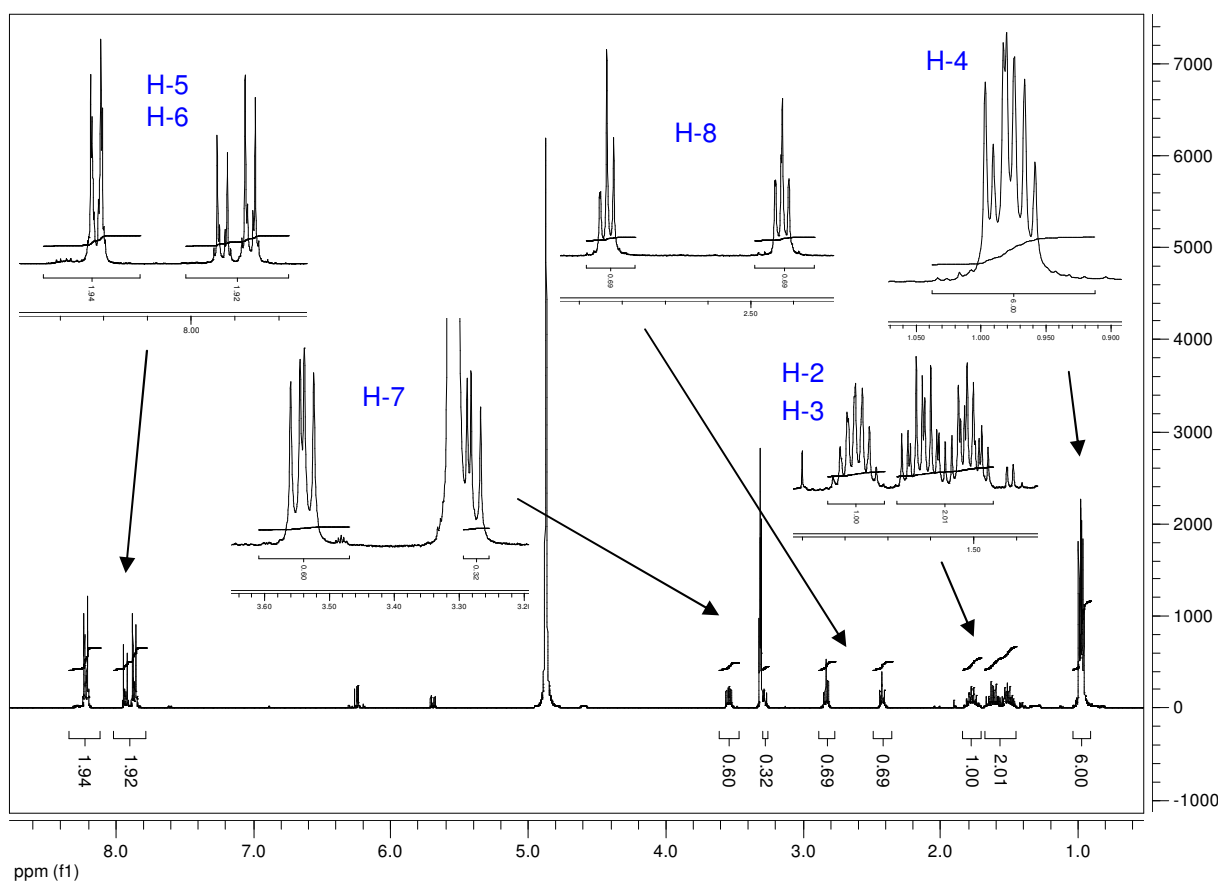
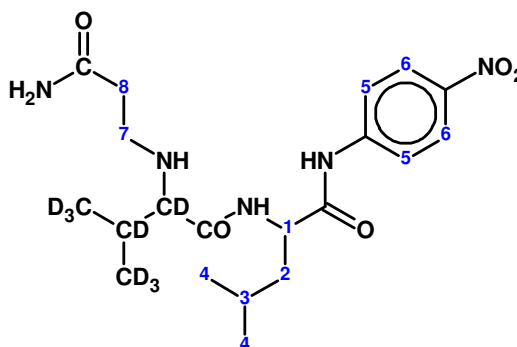


Abbildung 25: Ausschnitt aus dem ¹H-NMR-Spektrum von AAd₈Valyl-leucin-p-nitroanilid (400.13 MHz, d₄-Methanol, δ in ppm, 298 K) von 0.8-8.3 ppm

Tabelle 14: Zuordnung der Protonen im ¹H-NMR-Spektrum von AAd₈Valyl-leucin-p-nitroanilid

δ [ppm]	Charakterisierung
0,96-1,00	m, 6 H, H-4
1,50-1,63	m, 2 H, H-2
1,74-1,81	m, 1 H, H-3
2,41-2,44	m, 1 H, H-8
2,82-2,85	m, 1 H, H-8
3,27-3,29	m, 1 H, H-7



3,52-3,56	m, 1 H, H-7
7,85-8,23	m, 4 H, H-5, H-6

Das in Abbildung 25 dargestellte ^1H -NMR-Spektrum von AAd₈Valyl-leucin-p-nitroanilid zeigt die schon für L-d₈Valyl-L-leucin-p-nitroanilid (siehe 5.2.1) beschriebenen Signale, deren chemische Verschiebungen geringfügig verändert sind. Darüber hinaus treten die enantiotopen Protonen des Aminocarbonyl-ethyl-Substituenten als Multipletts bei ca. 2,41-2,85 ppm (H-8) sowie bei ca. 3,27-3,56 ppm (H-7) in Resonanz. Wie bereits bei der Ausgangssubstanz d₈Valyl-leucin-p-nitroanilid lässt sich im Spektrum ein Einfluss der Amidstruktur erkennen, besonders deutlich bei den aromatischen Protonen. Die Umsetzung des Acrylamids mit dem Dipeptid muss auf Grund der Integralverhältnisse der Signale dieses Spektrums als nicht vollständig bewertet werden. Es wird davon ausgegangen, dass die Standardsubstanz zu 65 % als AAd₈Valyl-leucin-p-nitroanilid vorliegt. Die übrigen 35 % liegen als d₈Valyl-leucin-p-nitroanilid vor. Die Standardsubstanz ist auf Grund der geringen Reinheit nur bedingt tauglich.

5.2.3 GAd₈Valyl-leucin-p-nitroanilid

Wie unter 5.2.2 beschrieben wird L-d₈Valyl-L-leucin-p-nitroanilid mit Glycidamid umgesetzt.

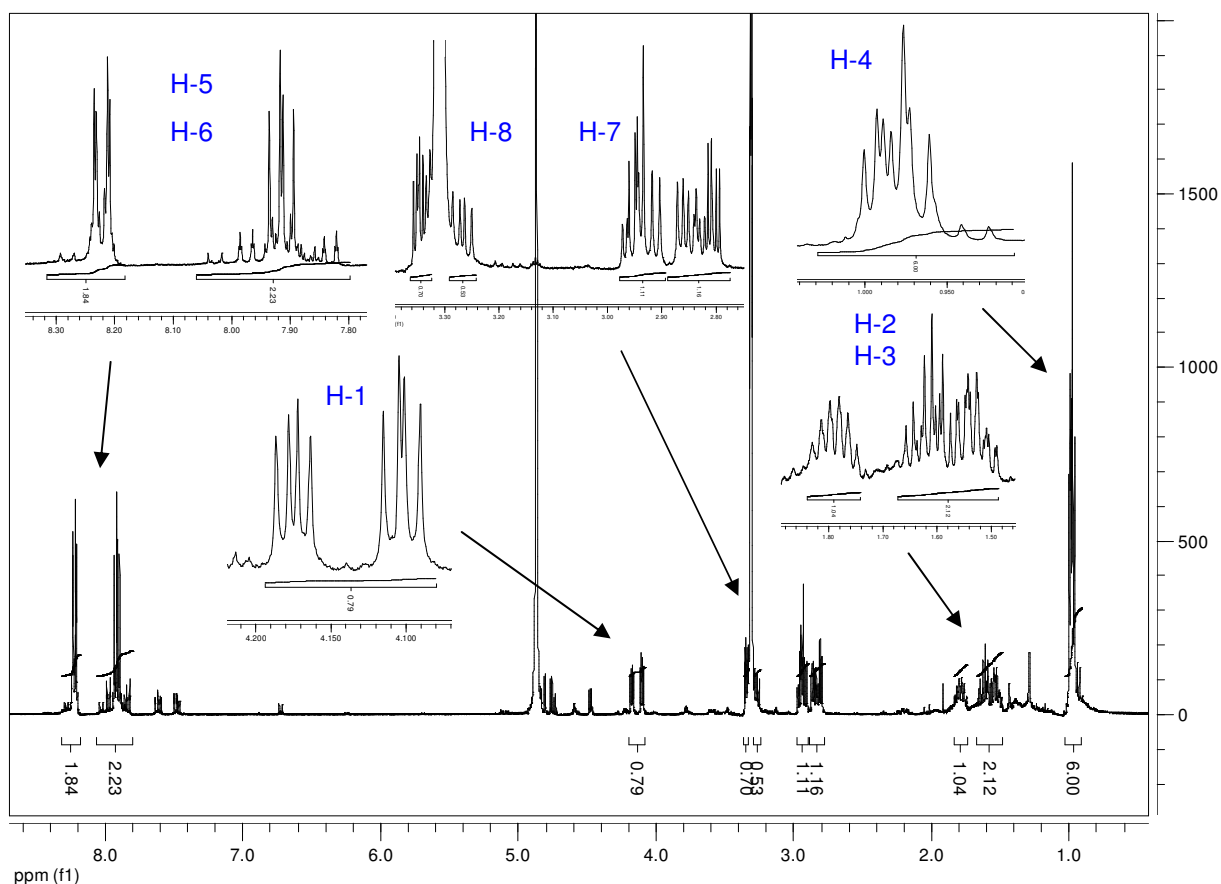
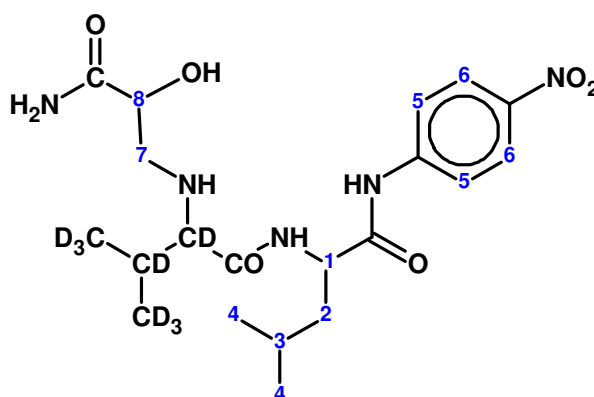


Abbildung 26: Ausschnitt aus dem ¹H-NMR-Spektrum von GAd₈Valyl-Leucin-p-nitroanilid (400.13 MHz, d₄-Methanol, δ in ppm, 298 K) von 0.8-8.3 ppm

Tabelle 15: Zuordnung der Protonen im ¹H-NMR-Spektrum von AAd₈Valyl-leucin-p-nitroanilid

δ [ppm]	Charakterisierung
0,96-1,00	m, 6 H, H-4
1,53-1,64	m, 2 H, H-2
1,77-1,81	m, 1 H, H-3
2,79-2,97	m, 2 H, H-7
3,25-3,36	m, 1 H, H-8
4,09-4,19	m, 1 H, H-1
7,89-8,24	m, 4 H, H-5, H-6



In dem in Abbildung 26 dargestellten relevanten Ausschnitt des ^1H -NMR-Spektrums von $\text{GAd}_8\text{Valyl-leucin-p-nitroanilid}$ treten deutlich die Signale des Aminocarbonylhydroxyethyl-Substituenten als Multipletts bei ca. 2,79-2,97 ppm (H-7) und bei ca. 3,25-3,36 ppm in Resonanz. Basierend auf dem Verhältnis zu den bereits in 5.2.1 beschriebenen Signalen der übrigen Protonen kann die Umsetzung des Glycidamids mit dem Dipeptid als nahezu vollständig bewertet werden.

5.3 Etablierung der Edmanabbau-Methodik

5.3.1 Messung der Pentafluorphenylthiohydantoinderivate von AA und GA mit LC/MS/MS

5.3.1.1 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen; Linearität

Zur Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden die Standardsubstanzen AAVal-PFPTH und GAVal-PFPTH im Bereich von 25-100 nM (0.625-2.5 pmol abs.) gemessen, da in diesem Konzentrationsbereich die Analytsignale noch vom Grundrauschen unterscheidbar sind. Aus den resultierenden Kalibriergeraden (s. Anhang) wurden die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für beide Analyte gemäß der DIN-Vorschrift 32645 ermittelt [Gottwald, 2000].

Tabelle 16: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für AAVal-PFPTH und GAVal-PFPTH für die Analytik mittels LC/MS/MS (gemessen in Methanol)

	AAVal-PFPTH	GAVal-PFPTH
Nachweisgrenze [pmol]	1,0	0,2
Bestimmungsgrenze [pmol]	3,3	0,3

Für den untersuchten Messbereich wurde Linearität gezeigt (s. Anhang).

5.3.1.2 Fragmentierung von AAVal-PFPTH und GAVal-PFPTH

Die Entwicklung einer MRM-Methode zur Bestimmung der PFPTHs von AA und GA bedingt die Kenntnis der, unter den für die Molekülonen optimierten Bedingungen,

erzeugten Fragmentionen. Die Fragmentionen werden mit Hilfe eines Produktionenscans erhalten. Die vermutete Fragmentierung der Analyten AAVaI-PFPTH und GAVaI-PFPTH ergab sich wie nachfolgend dargestellt:

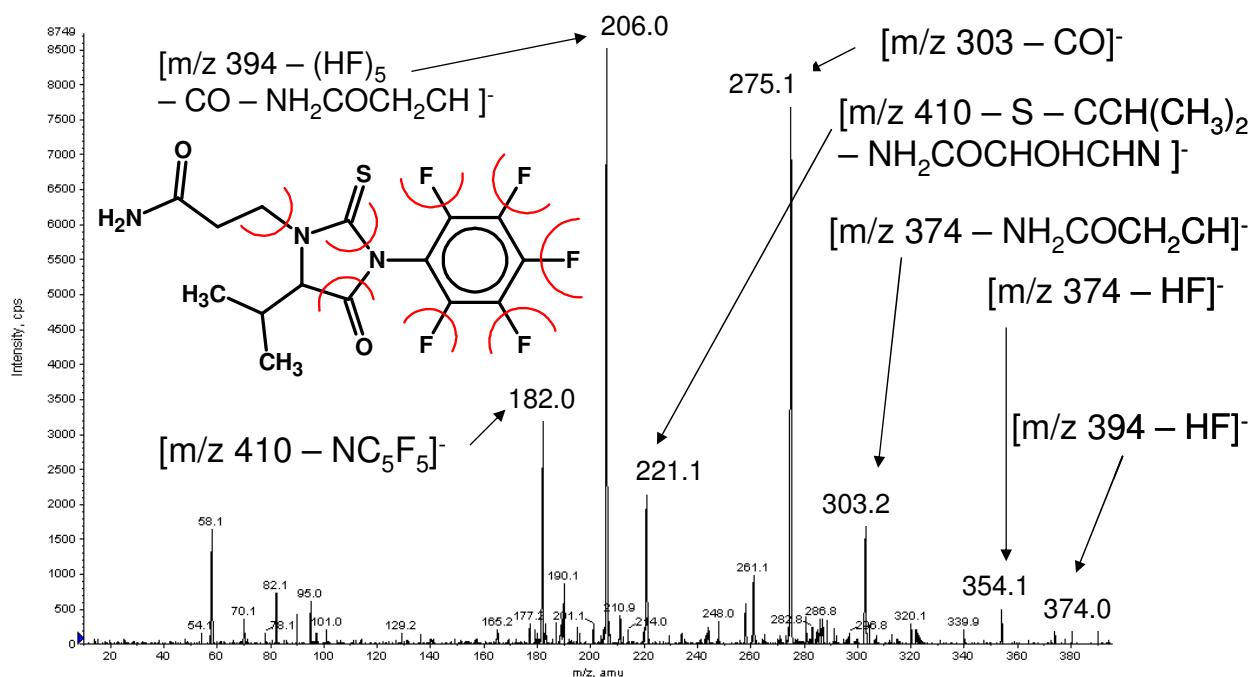


Abbildung 27: Produktionenscan und Fragmentierungsmuster von AAVaI-PFPTH mittels LC/MS/MS (APCI, negativ)

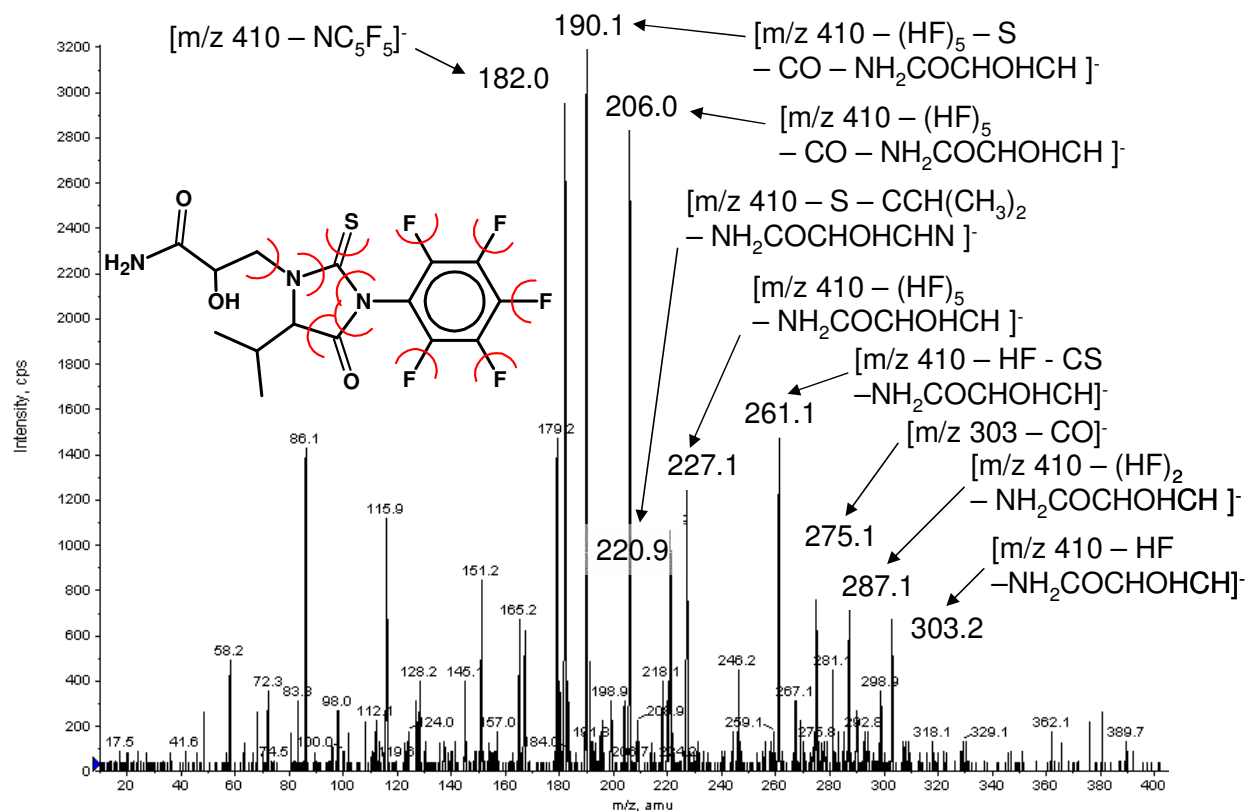


Abbildung 28: Produktionenscan und Fragmentierungsmuster von GAVaI-PFPTH mittels LC/MS/MS (APCI, negativ)

Ausgehend von den Produktionenscans werden für die MRM-Methode die Übergänge 394 m/z → 275 m/z (Quantifier) und 394 m/z → 303 m/z (Qualifier) für AAd₇Val-PFPTH und 410 m/z → 206 m/z (Quantifier) und 410 m/z → 182 m/z (Qualifier) für GAd₇Val-PFPTH verwendet. Für den internen Standard AAd₇Val-PFPTH fanden die entsprechenden Übergänge 401 m/z → 281 m/z (Quantifier) und 401 m/z → 310 m/z (Qualifier) Verwendung.

5.3.2 Messung der Pentafluorphenylthiohydantoinderivate von AA und GA mit GC/MS

5.3.2.1 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der reinen Standardsubstanzen

Zur Bestimmung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen wurden die Standardsubstanzen AAd₇Val-PFPTH und acGAd₇Val-PFPTH im Bereich von 0,3-21,8 fmol gemessen. Aus den resultierenden Kalibriergeraden (s. Anhang) wurden die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für beide Analyte (gemäß der DIN-Vorschrift 32645) wie in Tabelle 17 angegeben erhalten.

Tabelle 17: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der PFPTH-Standards für die Analytik mittels GC/MS (gemessen in Methanol)

	AAd ₇ Val-PFPTH	acGAd ₇ Val-PFPTH
Nachweisgrenze [fmol]	0,4	1,6
Bestimmungsgrenze [fmol]	3,1	8,0

Die Sensitivität der angewendeten GC/MS-Methodik ist für die Standardsubstanz AAd₇Val-PFPTH deutlich besser als für die Standardsubstanz acGAd₇Val-PFPTH. Dies begründet sich im Wesentlichen auf der Tatsache, dass sich die Fläche von acGAd₇Val-PFPTH auf zwei Signale auf trennt. Da bei diesem Verfahren der Einfluss der Matrix auf die Signalintensität nicht erfasst wird, können die oben angegebenen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen nicht in der üblicherweise verwendeten Einheit pmol/g Hb angegeben werden. Deshalb ist die Relevanz dieser Werte für die matrixhaltigen Proben nicht geklärt.

5.3.2.2 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen in der Probenmatrix

Um Nachweis- und Bestimmungsgrenzen zu erhalten, welche für die Bestimmung der Adduktgehalte in den biologischen Proben relevant sind, wurden Dotierungsversuche in aufgearbeiteten Proben durchgeführt. Die detaillierten Ergebnisse finden sich im Anhang. Es wurden unter Verwendung der DIN-Vorschrift 32645 die nachfolgend angegebenen Nachweis- und Bestimmungsgrenzen ermittelt.

Tabelle 18: Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der PFPTH-Standards in der Matrix mittels GC/MS

	AAVal-PFPTH	acGAVal-PFPTH
Nachweisgrenze [pmol/g Hb]	0,27	0,55
Bestimmungsgrenze [pmol/g Hb]	0,92	2,30

Es zeigt sich eine höhere Sensitivität für die Bestimmung von AAVal-PFPTH im Vergleich zu acGAVal-PFPTH, die auf der Verteilung der Peakfläche auf zwei Signale für acGAVal-PFPTH beruht.

5.3.2.3 Bestimmung der Variationskoeffizienten

Die Genauigkeit (Accuracy) in der Bestimmung des AAVal- und GAVal-Gehaltes einer einzelnen Probe wurde durch jeweils sechsfache Messung einer aufgearbeiteten Blutprobe bestimmt.

Um den Einfluss der Aufarbeitung auf die Varianz der Messwerte (Precision) zu erfassen, werden die AAVal- sowie GAVal-Gehalte von sechs unabhängig voneinander aufgearbeiteten Proben eines Probanden und Blutentnahmezeitpunktes gemessen.

Tabelle 19: Variationskoeffizienten für die GC/MS-Bestimmung von AAd₇Val-PFPTH und acGAd₇Val-PFPTH [%]

		AAVal	GAVal
Accuracy	intra-day	1,98	7,16
	inter-day	8,67	14,61
Precision	intra-day	8,23	7,04
	inter-day	9,64	12,84

Da die erhaltenen Variationskoeffizienten für AAVal und GAVal innerhalb des für biologische Proben tolerierbaren Bereichs von maximal 20% liegen, wird die angewendete analytische Methode zur Bestimmung von AAVal und GAVal als ausreichend robust beurteilt (Details siehe Anhang).

5.3.3 Alternative Probenaufarbeitungsmethoden

Die Resultate der beschriebenen alternativen Probenaufbereitungsverfahren sind im Folgenden wiedergegeben.

Variante B (2 Waschschr tte)

Die zusätzliche Durchführung eines zweiten Waschschr ttes hat keinen erkennbaren Einfluss auf das chromatographische Erscheinungsbild der Probenmatrix bei der GC/MS-Auswertung. Bei der Quantifizierung zeigten sich geringfügig kleinere Werte, die jedoch im Bereich der Schwankungsbreite liegen (s. Anhang). Auf Grund des höheren Aufwandes und da sich keine erkennbare Reduzierung der Probenmatrix erzielen ließ, wurde diese Variante nicht favorisiert.

Variante C (Destillationsmethode)

Die Auswertung der Proben erfolgte mit LC/MS/MS. Die Anwendung einer Wasserdampfdestillation sollte die Probenmatrix reduzieren und eine Erfassung der Hintergrundbelastung erleichtern. Es wurden jedoch auch von Destillaten hochdosierter Standardlösungen im Vergleich zur Standardlösung selbst nur sehr kleine Signale oder gar keine Signale erhalten. Aufgrund der offenbar zu geringen Wasserdampffl chtigkeit der Analyte kann diese Variante nicht angewendet werden.

Variante D (SPE und Fl ssiq/Fl ssiq-Extraktion an XTR)

Die Testung verschiedener Adsorber-Materialien (SiOH, C18, C18ec, XTR) mit einer Standardlösung ohne Probenmatrix ergab, bezogen auf die direkt gemessene Standardlösung, sehr hohe Wiederfindungsraten für die Umkehrphasen C18 (112,6%) und C18ec (92,1%), und geringe Wiederfindungsraten für die Normalphase (17,8%) und XTR-Phase (23,5%). Ein weiterer Wiederfindungsversuch mit H moglobinmatrix, unter Verwendung der C18-Phase (gute Wiederfindung) und der XTR-Phase (Eignung für matrixhaltige Proben), erbrachte geringe Wiederfindungen sowohl für die C18-Phase (0,016%) als auch für die XTR-Phase (0,017%). Bei der vergleichenden Aufarbeitung einer realen Blutprobe unter Anwendung der klassischen Extraktion durch Ausschütteln mit Diethylether und der Extraktion an der

XTR-Phase mit Diethylether oder Dichlormethan als Elutionsmittel, zeigte sich dass die gefundene Hintergrundbelastung von AAVal und GAVal bei der klassischen Extraktion und der Extraktion an der XTR-Phase mit dem Elutionsmittel Diethylether identische Ergebnisse lieferte. Die Extraktion an der XTR-Phase mit Dichlormethan ergab geringere Gehalte der Analyte. (Details s. Anhang)

Variante E (interne Kalibrierung mit Dipeptidstandards)

Anstelle der PFPTH-Standards wurden zur internen Kalibrierung Lösungen der deuterierten Dipeptidstandards zugesetzt. Da nicht davon ausgegangen werden kann, dass die Abspaltung der Addukte von Acrylamid und Glycidamid mit dem N-terminalen Valin des Hämoglobins und die damit einhergehende Bildung der entsprechenden Pentafluorphenylthiohydantoine zu 100 % stattfindet, liefert diese Art der Kalibrierung, bei der auch der Standard dieselbe Derivatisierungsreaktion wie der Analyt durchläuft, vermutlich präzisere Informationen über die tatsächliche Hintergrundbelastung mit Acrylamid und Glycidamid in humanem Blut. Durch die parallele Aufarbeitung von Proben desselben Spenders und desselben Blutentnahmezeitpunktes und Kalibrierung durch Zugabe der PFPTH-Standards ist auch ein direkter Vergleich der beiden Möglichkeiten der internen Kalibrierung möglich.

Bei Kalibrierung mit dem AAd₈Dipeptid ergibt sich für AAVal ein Adduktgehalt von 96 pmol/g Hb. Der entsprechende Adduktgehalt bei Kalibrierung mit AAd₇Val-PFPTH beträgt 33 pmol/g Hb. Durch die Verwendung des Dipeptidstandards lässt sich auch der Anteil des Adduktes, der nicht durch die Derivatisierung erfasst wird, berücksichtigen. Dabei wird vorausgesetzt, dass die Umsetzung des Dipeptids ebenso ausgeprägt ist wie im Hämoglobin. Folgerichtig lässt sich das Ergebnis dahingehend interpretieren, dass die Hintergrundbelastung des menschlichen Blutes mit Acrylamid tendenziell höher ist, als dies auf der Basis von Messungen mit PFPTH-Kalibrierung angenommen wurde. Eine entsprechende Tendenz zeigt sich auch für die Bestimmung des GAVal-Adduktgehaltes. Bei Kalibrierung mit dem GAd₈Dipeptid resultiert für GAVal ein Adduktgehalt von 128 pmol/g Hb, dass einem Wert von 34 pmol/g Hb, erhalten über Kalibrierung mittels acGAd₇ValPFPTH, gegenübersteht. Auf Grund der beschriebenen Unsicherheiten bei der Charakterisierung von GAd₈Dipeptid mittels ¹H-NMR-Spektroskopie ist die Quantifizierung mit Hilfe dieser Standardsubstanz jedoch schwierig und kann folglich

nur als Hinweis darauf dienen, dass bei der Kalibrierung mit den PFPTH-Standards zu geringe Adduktgehalte erhalten werden.

5.4 Hintergrundbelastung des humanen Blutes mit Acrylamid und Glycidamid

Es wurde das Blut von 24 Probanden, 20 Nichtrauchern und 4 Rauchern, auf den im menschlichen Blut vorkommenden Gehalte an Acrylamid- und Glycidamid-Addukten des N-terminalen Valins im Hämoglobin untersucht.

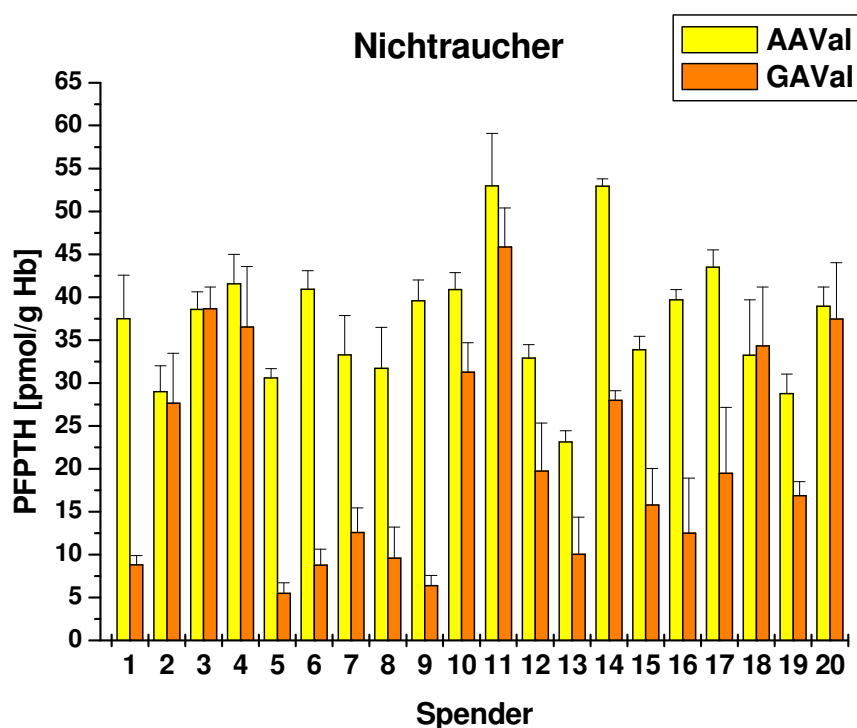


Abbildung 29: Hintergrundbelastung von Acrylamid und Glycidamid in 20 Nichtrauchern mittels GC/MS

Die Hintergrundbelastung der Nichtraucher an Acrylamid, gemessen als AAVal-Addukt, beträgt durchschnittlich $37,2 \pm 7,5$ pmol AAVal/g Hb und variiert in einem Bereich von 23,1 bis 53,0 pmol AAVal/g Hb. Ein Acrylamid-Adduktgehalt von 37 pmol/g Hb entspricht einer *in vivo* Dosis von $0,14 \mu\text{M} \times \text{h/Tag}$, aus der sich eine Acrylamidaufnahme von $1,00 \mu\text{g}$ pro kg KG und Tag ergibt [Bergmark, 1997, Osterman-Golkar und Ehrenberg, 1983]. Die Hintergrundbelastung der Nichtraucher an Glycidamid, gemessen als GAVal-Addukt, beträgt im Durchschnitt $21,3 \pm 12,6$ pmol GAVal/g Hb. Die Messwerte liegen im Bereich von 5,5 bis 45,9 pmol

GAVal/g Hb. Bei allen 20 Nichtrauchern findet sich ein Gehalt an GAVal, der teilweise deutlich niedriger oder annähernd gleich hoch wie der Gehalt an AAVal ist. Der GAVal-Gehalt beträgt im Durchschnitt 56,5 % bezogen auf den jeweiligen AAVal-Gehalt des Spenders und variiert damit über einen weiten Bereich (16,1 bis 103,3 %). Das durchschnittliche Verhältnis von GAVal zu AAVal von 0,57 darf jedoch nicht als direktes Maß für die metabolische Umwandlung von Acrylamid zu Glycidamid interpretiert werden, da neben der unterschiedlichen Reaktivität der beiden Substanzen gegenüber dem N-terminalen Valin des Hämoglobin, die Interaktion mit weiteren nukleophilen Zentrum im Blut und anderen Kompartimenten des Körpers dieses Verhältnis beeinflussen können. Bezogen auf den jeweiligen Spender kann das GAVal/AAVal-Verhältnis jedoch als einen Hinweis auf den CYP 2E1-Phänotypen angesehen werden.

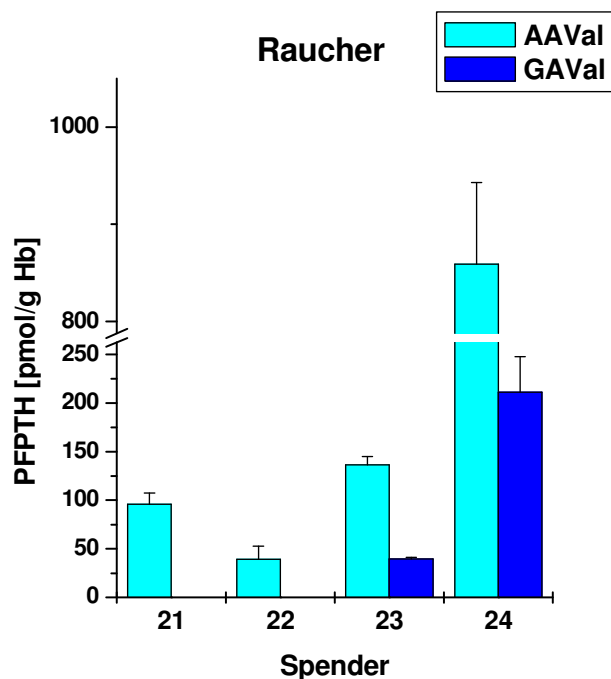


Abbildung 30: Hintergrundbelastung von Acrylamid und Glycidamid in 4 Rauchern (bei Spender 21 und 22 nur AAVal quantifiziert) mittels GC/MS

Der Gehalt an AAVal im Blut von Rauchern ist deutlich höher als bei den Nichtrauchern. Der Gehalt an AAVal wurde bei vier Spendern ermittelt, von denen ein Spender (24) extrem hohe Werte zeigt. Bei Betrachtung der übrigen Spender (21-23) zeigt sich ein durchschnittlicher Level an AAVal von $90,6 \pm 48,7$ pmol/g Hb. Obwohl die Höhe des AAVal-Gehaltes bei Rauchern durch die Menge des Tabakkonsums beeinflusst wird und deshalb zwischen den einzelnen rauchenden Spendern erkennbare Unterschiede aufweist, lässt sich feststellen, dass der Gehalt

an AAVal im Blut von Rauchern gegenüber den Nichtrauchern ca. 3-fach höher liegt. Der extrem hohe Gehalt an AAVal von 858,8 pmol/g Hb bei Spender 24 weist auf eine besonders hohe Belastung des Spenders mit Acrylamid hin. Ein methodischer Fehler kann ausgeschlossen werden, da dieser Befund auch durch eine weitere unabhängige Untersuchung bestätigt wurde und bei demselben Spender auch extrem hohe Gehalte der Mercaptursäure von Acrylamid (AAMA) quantifiziert wurden (Daten nicht gezeigt). Der Gehalt an GAVal ist bei Spender 24 mit 211,1 pmol/g Hb ebenfalls deutlich höher als bei den übrigen Rauchern. Es wurden nur bei Spender 23 und 24 die AAVal- und GAVal-Gehalte quantifiziert. Das gefundene Verhältnis von GAVal zu AAVal beträgt 0,27 und ist damit geringer als bei den Nichtrauchern (0,56). Auf Grund der geringen Anzahl der untersuchten Raucher und der extrem hohen AAVal/GAVal-Gehalte eines einzelnen Spenders kann kein eindeutiger Rückschluss auf eine Verschiebung des GAVal/AAVal-Verhältnisses bei einer erhöhten Aufnahme von Acrylamid z.B. durch Rauchen gezogen werden.

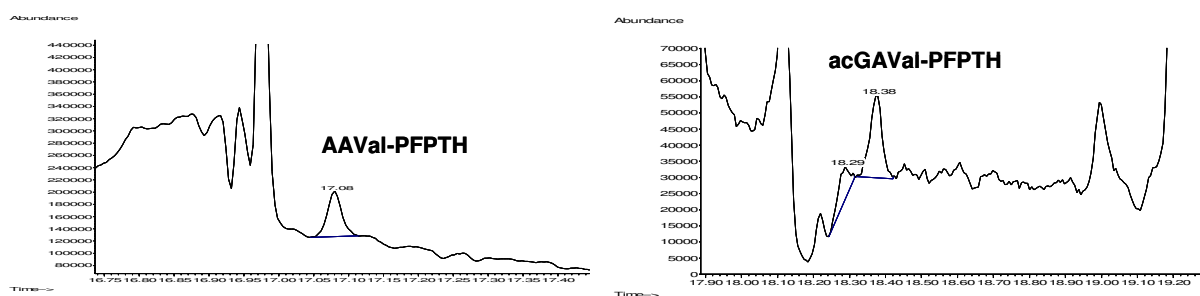


Abbildung 31: GC/MS-Chromatogramme der Hintergrundbelastung (markierte Signale) mit Acrylamid (linke Abb.) und Glycidamid (rechte Abb.) im humanen Blut von Nichtrauchern

5.5 Dosimetrie

Die Dosimetrie der Adduktbildung von AA und GA mit dem N-terminalen Valin des Hämoglobins wurde mittels LC/MS/MS und GC/MS untersucht.

5.5.1 Dosimetrie der Adduktbildung von AA und GA mit dem N-terminalen Valin des Hämoglobins mittels LC/MS/MS

Die Adduktbildung von Acrylamid mit dem N-terminalen Valin des Hämoglobins verläuft über einen weiten Konzentrationsbereich linear. Dies wurde für

Inkubationskonzentrationen an Acrylamid von 30 μ M, 300 μ M und 3 mM für die Inkubationszeiten 6, 24 und 72 h gezeigt.

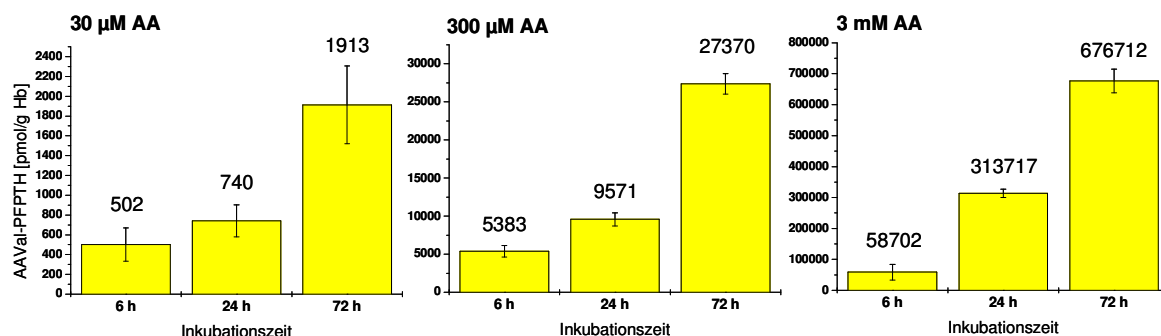


Abbildung 32: Bestimmung der Adduktbildung von AAVal mittels LC/MS/MS nach Inkubation des humanen Vollblutes mit AA (Darstellung der durch die Inkubation gebildeten Adduktmenge)

Nach sechsständiger Inkubation mit 30 μ M Acrylamid wird ein Gehalt an AAVal-PFPTH von 502 pmol/g Hb bestimmt. Der Zuwachs des Adduktgehaltes durch die Inkubation ausgehend von dem im Spenderblut vorhandenen Hintergrundadduktlevel kann nicht dargestellt werden, da dieses unterhalb der Bestimmungsgrenze liegt und somit nicht quantifiziert werden kann. Nach 3 Tagen Inkubationszeit wird ein Gehalt an AAVal-PFPTH von 1913 pmol/g Hb gefunden. Die Linearität der Adduktbildung in Abhängigkeit der eingesetzten Acrylamidmenge lässt sich besonders gut bei einem Vergleich der 6 h-Werte erkennen (502, 5383, 58702 pmol AAVal/g Hb), da in diesem Zeitfenster eine noch vernachlässigbar gering ausgeprägte Hämolyse stattfindet und die Extraktion der PFPTH-Derivate deshalb entsprechend gut durchführbar ist. Der Anstieg des AAVal-Adduktgehaltes bei Inkubation mit 3 mM Acrylamid von 58702 pmol/g Hb (6 h) auf 676712 pmol/g Hb nach 72 h zeigt die hohe Kapazität dieses Biomarkers. Die verwendete Methodik ermöglicht jedoch nicht die Quantifizierung der Pentafluorphenylthiohydantoinderivate in dem für das Biomonitoring der Hintergrundbelastung relevanten Konzentrationsbereich von < 100 pmol Addukt/g Hb.

Ein linearer Verlauf der Adduktbildung von Glycidamid mit dem N-terminalen Valin des Hämoglobin kann nach Inkubation mit 30 μ M Glycidamid nach 6, 24 und 72 h festgestellt werden. Der GAVal-Adduktgehalt steigt in diesem Fall von 194 pmol/g Hb (6 h) auf 1143 pmol/g Hb an. Abweichungen von diesem Trend zeigen sich jedoch bei den Adduktgehalten nach Inkubation mit 300 μ M und 3 mM Glycidamid, da für den Zeitpunkt 24 h geringere Adduktgehalte als zum Zeitpunkt 6 h gemessen wurden. Da jedoch die Derivate der Addukte, die Pentafluorphenylthiohydantoinerivate von

Glycidamid, gemessen werden, ist eine zunächst linear verlaufene Adduktbildung durchaus denkbar. Es ist denkbar, dass durch Hämolyse eine Reduktion intakter Erythrozyten resultiert. Durch eine Auswaschung des im Plasma vorliegenden und deshalb vermutlich bevorzugt alkylierten Hämoglobins, könnte es sein, dass die Quantität der Adduktbildung nicht korrekt wiedergegeben wird.

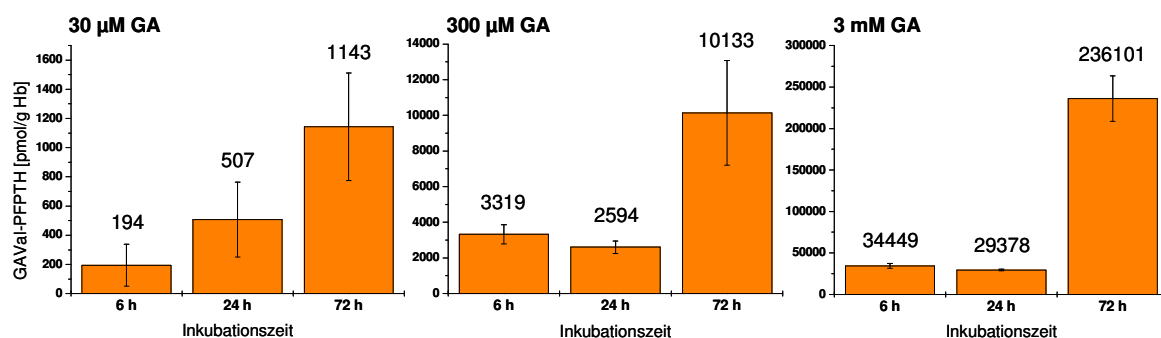


Abbildung 33: Bestimmung der Adduktbildung von GAVal mittels LC/MS/MS nach Inkubation des humanen Vollblutes mit GA (Darstellung der durch die Inkubation gebildeten Adduktmenge)

Die nach 72-stündiger Inkubation mit 3 mM Glycidamid gemessene Menge GAVal ist mit 236101 pmol/g Hb sehr hoch und zeigt wie bereits beim AAVal die nukleophile Kapazität des Hämoglobins. Auch im Fall des GAVal-PFPTH liegt die natürlicherweise im Spenderblut vorhandene Menge an GAVal-Addukt (Hintergrundbelastung) unterhalb der Bestimmungsgrenze dieser LC/MS/MS-Methodik.

Ein Vergleich der während der Inkubationen gebildeten Adduktmengen an AAVal und GAVal weist auf eine unterschiedliche Adduktbildungs-kinetik hin. Ohne Berücksichtigung der zu niedrigen GAVal-Werte für die 24 h-Messungen zeigt ein Vergleich der AAVal- und GAVal-Gehalte, dass die AAVal-Bildung um den Faktor 2-3 schneller als die GAVal-Bildung verläuft. Dabei ist jedoch zu beachten, dass auch bei der kürzesten Inkubationszeit von 6 Stunden möglicherweise bereits Teile des Glycidamids zu Glyceramid hydrolysiert sein können und somit für die Adduktbildung nicht mehr zur Verfügung stehen. Desweiteren ist auch neben der eigentlichen Reaktivität von Acrylamid oder Glycidamid gegenüber dem N-terminalen Valin des Hämoglobins auch der Einfluss von Konkurrenzreaktionen wie die Reaktion mit Thiolgruppen des Hämoglobins oder der Serumproteine sowie mit Glutathion in Betracht zu ziehen. Die Bildung von AAVal und GAVal ist also sowohl von der Konzentration der Elektrophile, ihrer unterschiedlichen Kinetik in Bezug auf das N-terminale Valin als auch ihrer Kinetik mit anderen im System vorhandenen nukleophilen Zentren abhängig.

Tabelle 20 fasst die Ergebnisse der LC/MS/MS-Messungen zusammen.

Tabelle 20: Ergebnisse der Dosimetrie mittels LC/MS/MS; dargestellt sind jeweils die Differenzen zwischen inkubierten Proben und nicht-inkubierten Proben (Hintergrundbelastung) in [pmol/g Hb]

Inkubations-zeit	AAVal [pmol/g Hb]			GAVal [pmol/g Hb]		
	30 μ M	300 μ M	3 mM	30 μ M	300 μ M	3 mM
6 h	502 \pm 168	5383 \pm 759	58702 \pm 25424	194 \pm 144	3319 \pm 535	34449 \pm 2936
24 h	740 \pm 162	9571 \pm 865	313717 \pm 13518	507 \pm 256	2594 \pm 352	29378 \pm 836
72 h	1913 \pm 395	27370 \pm 1353	676712 \pm 38528	1143 \pm 368	10133 \pm 2940	236101 \pm 27409

5.5.2 Dosimetrie der Adduktbildung von AA und GA mit dem N-terminalen Valin des Hämoglobins mittels GC/MS

Die Untersuchung der Adduktbildung von Acrylamid und Glycidamid mit dem N-terminalen Valin des Hämoglobins war mit Hilfe der GC/MS-Technik in einem niedrigeren Konzentrationsbereich und kürzeren Inkubationszeiten möglich als mit Hilfe der LC/MS/MS-Technik. Durch die höhere Sensitivität der GC/MS-Technik gelingt auch die Quantifizierung der Hintergrundbelastung des humanen Blutes mit Acrylamid und Glycidamid. Die Blutproben wurden mit 0,3, 3 und 10 μ M Acrylamid bzw. Glycidamid für 1 h oder 4 h inkubiert. Für jeden Spender wurden jeweils für die Inkubationen mit Acrylamid und Glycidamid pro Konzentration sowie der Hintergrundbelastung vier voneinander unabhängige Proben aufgearbeitet (eine Blutabnahme). Die Anzahl der Spender für die jeweilige Inkubationszeit variierte und ist im Anhang dargestellt. Die Höhe des Adduktgehaltes in den nicht inkubierten Blutproben (Hintergrundbelastungen) der 17 Blutspender stellt jeweils den Ausgangswert der Dosimetrie dar. Für AAVal beträgt die Hintergrundbelastung in den für die Dosimetrie verwendeten Proben durchschnittlich $39,8 \pm 6,3$ pmol/g Hb (Median: 38,0 pmol/g Hb, Range: 34,1-52,6 pmol/g Hb). Die entsprechende Hintergrundbelastung an GAVal beträgt durchschnittlich $17,6 \pm 13,3$ pmol/g Hb (Median: 12,6 pmol/g Hb, Range: 5,5-45,9 pmol/g Hb). Es zeigt sich, dass die GAVal-Hintergrundbelastung der Spender in einem größeren Maß variiert als die AAVal-Hintergrundbelastung.

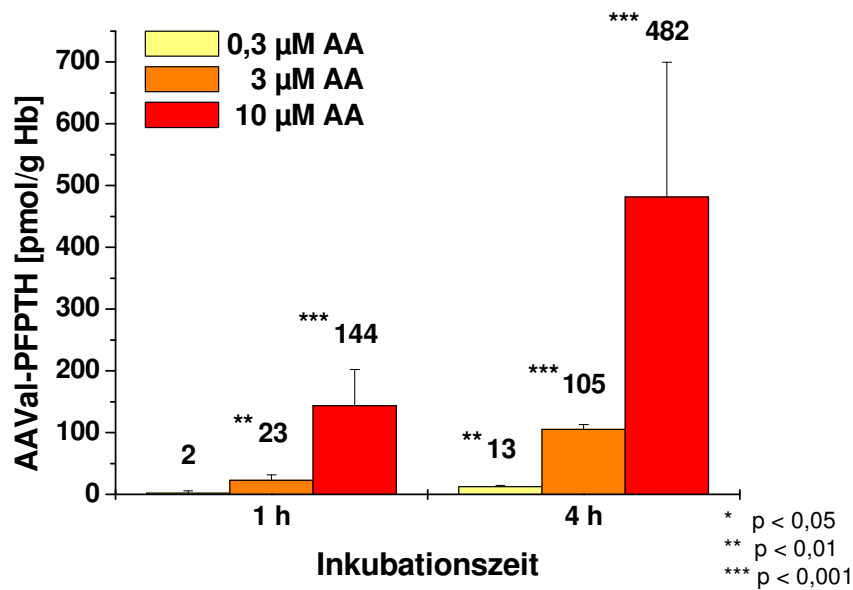


Abbildung 34: Adduktbildung von AAVaI mittels GC/MS (Darstellung der durch die Inkubation gebildeten Adduktmenge)

Nach einstündiger Inkubation der humanen Blutproben mit 0,3 µM Acrylamid lässt sich keine Erhöhung des Acrylamid-Adduktgehaltes gegenüber der nicht-inkubierten Probe (Hintergrundbelastung) feststellen (Abbildung 34). Bei Inkubation mit 3 µM Acrylamid wächst der Acrylamidadduktgehalt nach einer Stunde um 23 pmol/g Hb an. Dieser Zuwachs gegenüber der Hintergrundbelastung ist statistisch signifikant ($p < 0,01$). Nach einstündiger Inkubation mit 10 µM Acrylamid wird ein statistisch signifikanter Zuwachs des Acrylamidadduktgehaltes von 144 pmol/g Hb induziert ($p < 0,001$). Eine chromatographische Darstellung ist in Abbildung 35 gegeben.

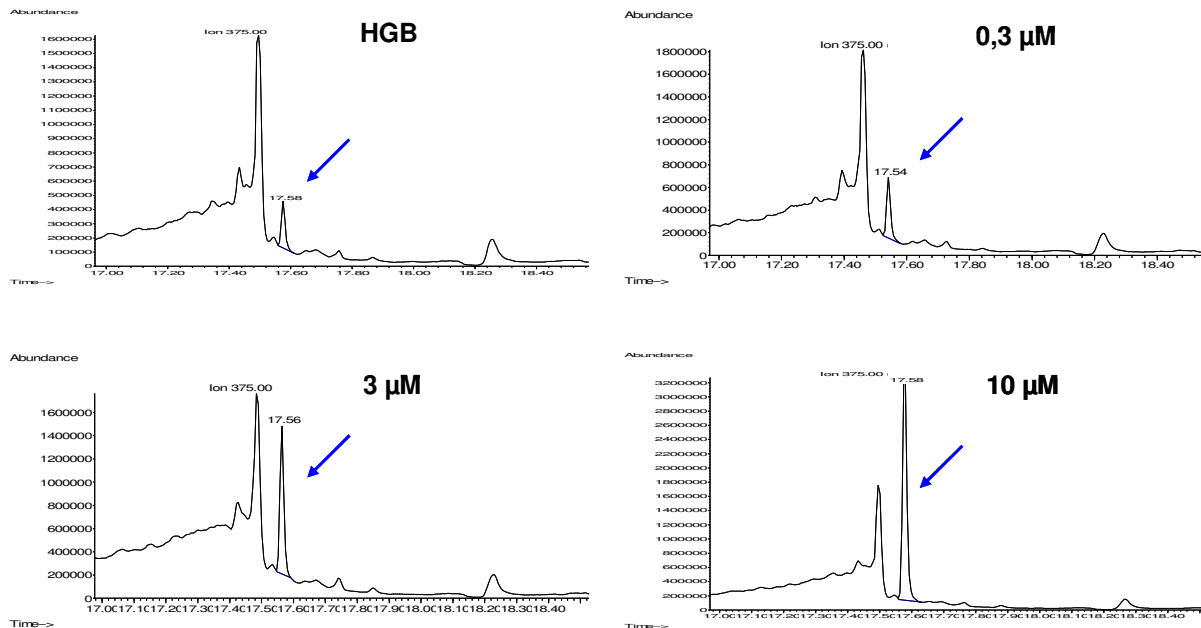


Abbildung 35: Signalzuwachs von AAVal bei vierstündiger Inkubation mit verschiedenen Acrylamid-Konzentrationen (GC/MS); HGB: Hintergrundbelastung

Nach einer Verlängerung der Inkubationszeit auf 4 Stunden ist bereits durch eine Inkubation mit 0,3 µM Acrylamid eine statistisch signifikante Erhöhung von AA-Val um 13 pmol/g Hb zu beobachten ($p < 0,01$). Die vierstündigen Inkubationen mit 3 und 10 µM Acrylamid führen zu statistisch signifikanten AAVal-Erhöhungen um 105 bzw. 482 pmol/g Hb ($p < 0,001$). Die Bildung des Acrylamidadduktes AAVal verläuft in dem untersuchten Zeitraum von 1 und 4 Stunden bei Inkubationskonzentrationen von 0,3, 3 und 10 µM Acrylamid linear (Abbildung 34).

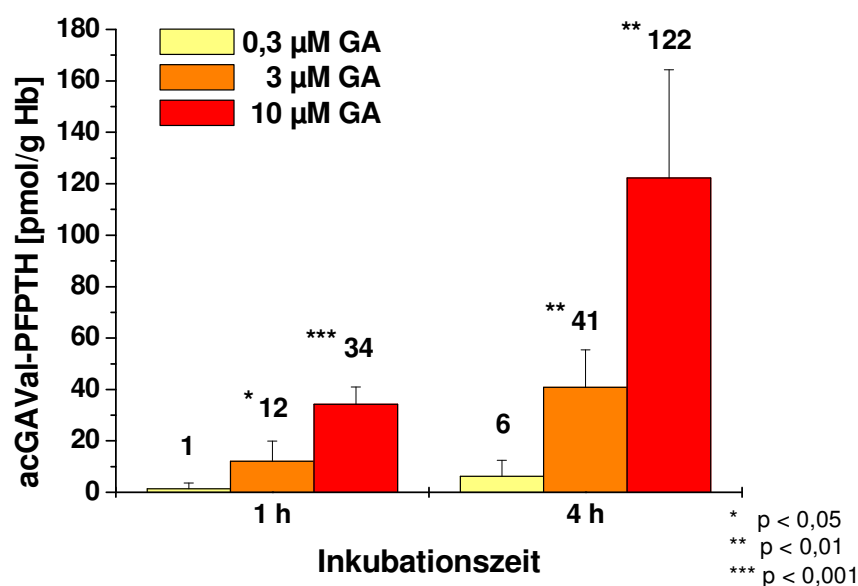


Abbildung 36: Adduktbildung von GAVal mittels GC/MS (Darstellung der durch die Inkubation gebildeten Adduktmenge)

Die Inkubation von Vollblut mit 0,3 μM Glycidamid führt weder nach einstündiger noch nach vierstündiger Inkubation zu einer deutlichen Erhöhung des Glycidamid-Adduktgehaltes (Abbildung 36). Nach einstündiger Inkubation mit 3 μM Glycidamid ist eine statistisch signifikante Zunahme von GAVal um 12 pmol/g Hb festzustellen ($p < 0,05$). Eine Inkubation mit 10 μM Glycidamid resultiert in einem statistisch signifikanten GAVal-Anstieg von 34 pmol/g Hb ($p < 0,001$). Eine chromatographische Darstellung ist in Abbildung 37 gegeben.

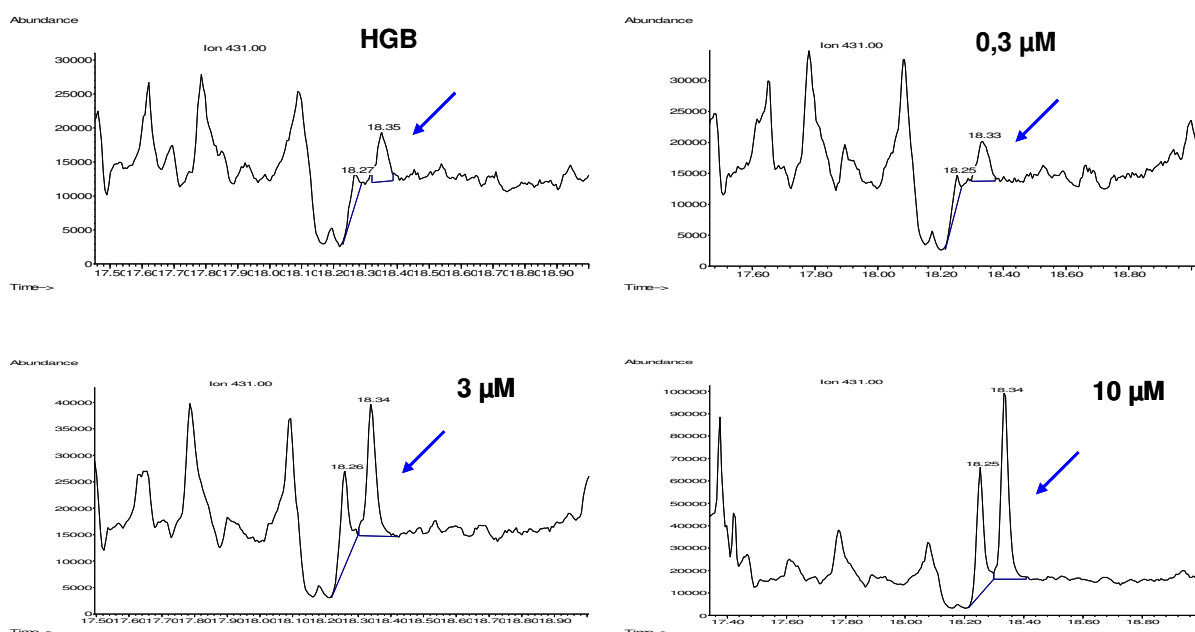


Abbildung 37: Signalzuwachs von GAVal bei vierstündiger Inkubation mit verschiedenen Glycidamid-Konzentrationen (GC/MS); HGB: Hintergrundbelastung

Eine vierstündige Inkubation mit 3 μM Glycidamid bewirkt einen statistisch signifikanten Zuwachs des Glycidamid-Adduktgehaltes um 41 pmol/g Hb ($p < 0,01$), während 10 μM Glycidamid einen Anstieg um 122 pmol/g Hb bewirken ($p < 0,01$).

Die Adduktbildung von Glycidamid mit dem N-terminalen Valin des Hämoglobins verläuft unter denselben Inkubationsbedingungen ebenfalls linear. Der resultierende Anstieg der Glycidamid-Adduktgehalte ist im Vergleich zu dem Anstieg der entsprechenden Acrylamid-Adduktgehalte jedoch geringer ausgeprägt (Faktor 2-4). Dies kann durch eine geringer ausgeprägte Reaktivität des Glycidamids gegenüber dem N-terminalen Valin bedingt sein. Es zeigten sich im zeitlichen Verlauf keine Unterschiede im Anstieg des GAVal-Gehaltes (oder auch des Acrylamid-Adduktgehaltes) zwischen Proben, die mit den unmittelbar angesetzten Glycidamidlösungen inkubiert wurden und solchen, bei denen auf die eingefrorenen

Lösungen zurückgegriffen wurde (Lagerung bei -20 °C, nicht länger als 4 Wochen). Da die Inkubationslösungen mindestens zweimal mit unabhängigen Einwaagen angesetzt wurden, und die daraus resultierenden GAVal-Gehalte nicht erkennbar voneinander abwichen, ist der beobachtete Unterschied in der Adduktbildungsrate von Acrylamid und Glycidamid mit dem N-terminalen Valin im Hämoglobin nicht auf technisch bedingte Einflüsse zurückzuführen. Bei Reaktionen in einem komplexen biologischen Kompartiment wie dem humanen Vollblut müssen auch andere Möglichkeiten der Interaktion in Betracht gezogen werden. Wichtig sind hier die Reaktionen von Glycidamid mit anderen nukleophilen Zentren, die gerade bei niedrigen Elektrophil-Konzentrationen eine größere Relevanz für die Adduktbildung am N-terminalen Valin haben können. Tendenziell zeigt sich der Unterschied zwischen der Adduktbildung von Acrylamid und Glycidamid jedoch auch in höheren Konzentrationsbereichen, wie die Adduktbildungsmessungen mit LC/MS/MS erkennen lassen.

Tabelle 21: Zusammenfassung der Ergebnisse der Dosimetrie mittels GC/MS; dargestellt sind jeweils die Differenzen zwischen inkubierten Proben und nicht-inkubierten Proben (Hintergrundbelastung) in [pmol/g Hb]

Inkubations- zeit	AAVal [pmol/g Hb]			GAVal [pmol/g Hb]		
	0,3 µM	3 µM	10 µM	0,3 µM	3 µM	10 µM
1 h	2,5 ± 3,6	23,0 ± 8,7	143,8 ± 58,6	1,3 ± 2,3	12,1 ± 7,8	34,3 ± 6,7
4 h	12,5 ± 2,0	105,3 ± 7,9	481,5 ± 217,9	6,2 ± 6,2	40,8 ± 14,5	122,3 ± 42,0

5.6 Ermittlung der *in vivo* Adduktbildung von Acrylamid und Glycidamid mit dem N-terminalen Valin des Hämoglobins im Rahmen der humanen Verzehrsstudie „Bedeutung der CYP 2E1-Aktivität für die Toxikokinetik von Acrylamid beim Menschen“

5.6.1 Auswertung der Hämoglobinadduktbildung

Es wurden Blutproben hinsichtlich der *in vivo* Adduktbildung von Acrylamid bzw. Glycidamid mit dem N-terminalen Valin des Hämoglobins im Rahmen der humanen Verzehrsstudie „A Phase I/IV, Open Label, 4-Way-Change-Over Pilot Study to Evaluate Toxicokinetics of Acrylamide and its Metabolite Glycidamide Following Ingestion of Acrylamide Containing Food and Acrylamide Containing Food in Combination with Alcohol in Sixteen Healthy Male and Female Volunteers“ (Study number: KPUK-03-ACR/PIL-01) untersucht. Die in dieser Studie bestimmten Parameter wurden nach Acrylamidgabe ohne Comedikation, nach Acrylamidgabe in Gegenwart des CYP 2E1-Inhibitors Disulfiram und eine sich der Induktion von CYP 2E1 durch einwöchig täglich erfolgte Aufnahme von Ethanol anschließende Acrylamidgabe bestimmt. [Fuhr und Schömig, 2005]

P Phänotypisierung von CYP 2E1 250 mg Chlorzoxazone	R Referenzphase 1 mg AA	T1 Testphase 1 1 mg AA + 500 mg Disulfiram	T2 Testphase 2 1 mg AA + 48 ml Ethanol/Tag
---	--------------------------------------	--	--

Abbildung 38: Schema der Studienphasen; die Gabe von Acrylamid erfolgte in Form von Kartoffelchips

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Gehalte an AAVal und GAVal im Blut der Probanden 04, 07 und 10 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Gabe von 1 mg Acrylamid in Form von Kartoffelchips bestimmt. Ziel der Untersuchungen war es zu zeigen, ob und in welchem Ausmaß die Biomarker AAVal und GAVal von einer oral aufgenommenen Dosis von 1 mg pro Studienphase beeinflusst werden.

Proband 04

In der Abbildung 39 sind die Gehalte an AAVal und GAVal im Blut von Proband 04 für die Anfangs- und Endzeitpunkte aller drei Studienperioden angegeben.

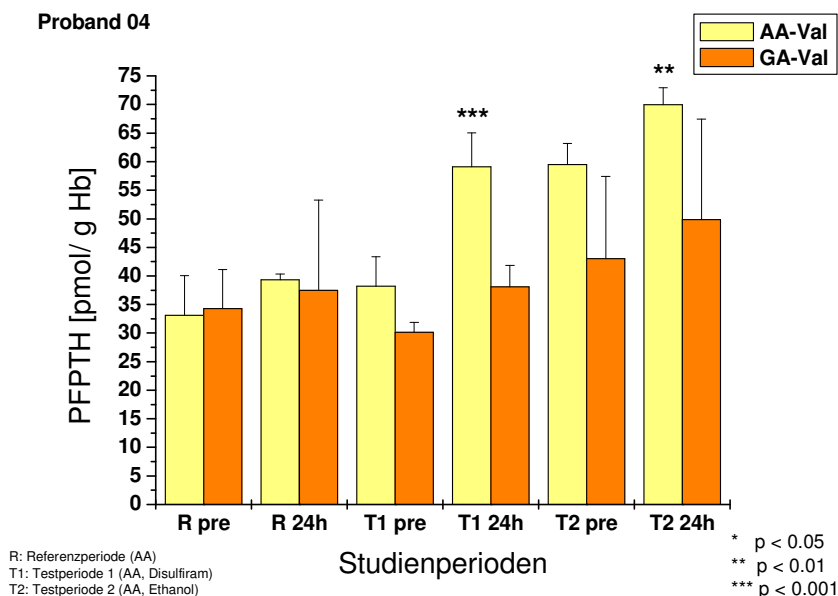


Abbildung 39: AAVal- und GAVal-Gehalte von Proband 04 vor Beginn und 24 Stunden nach Beginn der jeweiligen Studienperioden mittels GC/MS (zwischen den pre-Werten der jeweiligen Studienperioden liegen 2 Wochen)

In der Referenz-Periode (R), in der ausschließlich eine Gabe von Acrylamid erfolgte, steigt der AAVal-Gehalt, der vor Acrylamid-Gabe (pre) durchschnittlich 33 pmol/g Hb betrug, 24 h danach auf durchschnittlich 39 pmol/g Hb an. Der entsprechende GAVal-Gehalt steigt in demselben Zeitraum von 34 pmol/g Hb (pre) auf 37 pmol/g Hb (24 h) an. Diese Erhöhungen der Hb-Adduktgehalte in der Periode R weisen keine statistische Signifikanz auf. In der Testperiode 1 (T1), in der zusätzlich zu der Gabe von Acrylamid der CYP 2E1-Inhibitor Disulfiram verabreicht wurde, zeigt sich ein deutlicher Anstieg des AAVal-Gehaltes von durchschnittlich 38 pmol/g Hb auf durchschnittlich 59 pmol/g Hb, der statistisch signifikant ist ($p < 0.001$). In der Testperiode 2 (T2), in der zusätzlich zu der Gabe von Acrylamid der Konsum von Ethanol erfolgte, ist der Anstieg des AAVal-Gehaltes von durchschnittlich 59 pmol/g Hb auf 69 pmol/g Hb weniger deutlich als in der T1-Periode ausgeprägt, jedoch ebenfalls statistisch signifikant ($p < 0,01$). Über den gesamten Zeitraum der Studie betrachtet, ist ein Anstieg des AAVal-Gehaltes nach Gabe von insgesamt 3 mg Acrylamid von 33 pmol/g Hb auf 69 pmol/g Hb, d.h. um den Faktor 2, zu beobachten. Der Anstieg des GAVal-Gehaltes ist sowohl in der T1-Periode als auch in der T2-Periode deutlich vorhanden, jedoch muss diese Beobachtung auf Grund der teilweise

deutlichen Schwankungen dieses Biomarkers mit Vorsicht interpretiert werden. Über den gesamten Zeitraum der Studie betrachtet steigt der GAVal-Gehalt von durchschnittlich 34 auf 49 pmol/g Hb an, d.h. um den Faktor 1,4. Zwischen der Gabe von Acrylamid in den einzelnen Studienperioden liegt eine Auswasch-Phase von 2 Wochen. Es ist kein merklicher Abfall der Hb-Adduktgehalte zwischen den 24 h-Werten der vorangegangenen Studienperiode und den 13 Tage später bestimmten pre-Werten der darauffolgenden Studienperiode feststellbar.

In der Abbildung 40 ist der zeitliche Verlauf der Bildung von AAVal und GAVal unter Einbeziehung sämtlicher Zwischenmesspunkte dargestellt. Dabei ist zu beachten, dass die grauen Linien, welche die Studienperioden voneinander trennen, einen Zeitraum von 13 Tagen ersetzen, in dem keine Messzeitpunkte lagen.

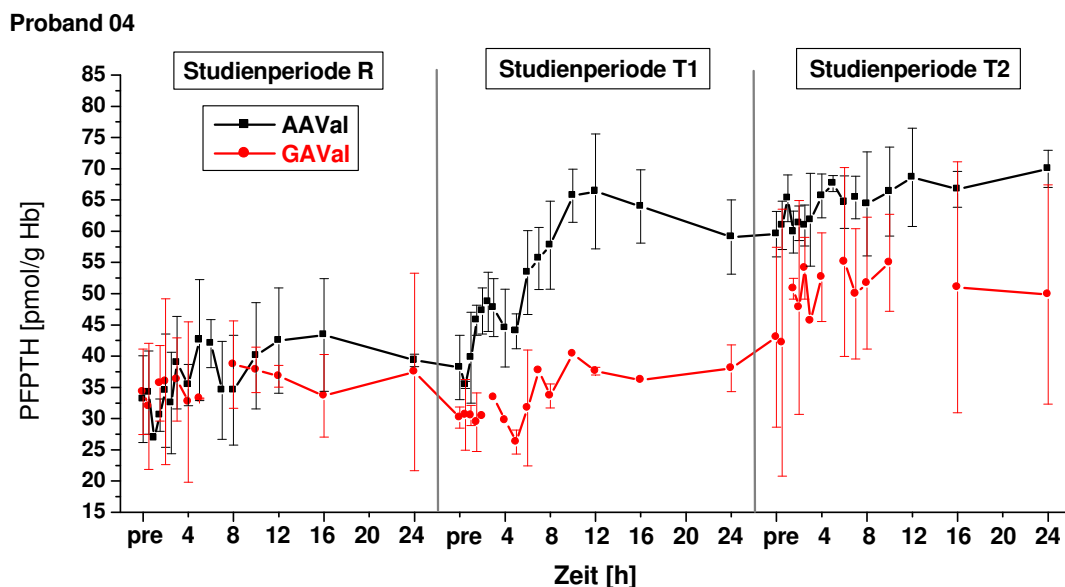


Abbildung 40: AAVal- und GAVal-Gehalte sämtlicher Messzeitpunkte von Proband 04 mittels GC/MS (zwischen den pre-Werten der jeweiligen Studienperioden liegen 2 Wochen)

Bei Betrachtung der Gesamtheit der Messzeitpunkte für diesen Probanden lässt sich besonders der deutliche Anstieg des Biomarkers AAVal in der Studienperiode T1 erkennen. Es zeigt sich, dass der AAVal-Gehalt bald nach Aufnahme des Acrylamids steil ansteigt und nach ungefähr 10-12 Stunden den Maximalwert für diese Studienperiode erreicht.

Proband 07

Abbildung 41 zeigt die Gehalte von AAVal und GAVal beim Probanden 07 für die Anfangs- und Endzeitpunkte aller drei Studienperioden.

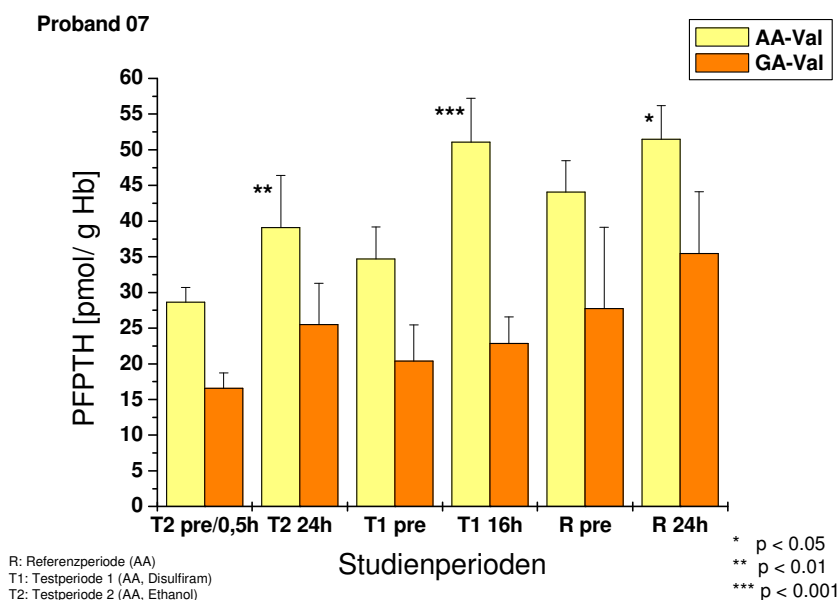


Abbildung 41: AAVal- und GAVal-Gehalte von Proband 07 zu Beginn und gegen Ende der jeweiligen Studienperioden mittels GC/MS (zwischen den pre-Werten der jeweiligen Studienperioden liegen 2 Wochen)

Beim Probanden 07 wurden die Studienperioden in der Reihenfolge T2, T1, R durchlaufen. Der Biomarker AAVal zeigt bei diesem Probanden in allen drei Studienperioden einen statistisch signifikanten Anstieg. In der T2-Periode steigt der durchschnittliche Gehalt an AAVal von 29 auf 39 pmol/g Hb ($p < 0.01$), in der T1-Periode von 35 auf 51 pmol/g Hb ($p < 0.001$) nach 16 h (24 h nicht verwendet da Ausreißer) und in der Referenzperiode von 44 auf 51 pmol/g Hb ($p < 0.05$). Wie bereits bei Proband 04 beobachtet ist der Anstieg des AAVal-Gehaltes in der Periode T1 im Vergleich zu den anderen Studienperioden am stärksten ausgeprägt. Über den gesamten Zeitraum der Studie betrachtet, ist ein Anstieg des AAVal-Gehaltes nach Gabe von insgesamt 3 mg Acrylamid von 29 pmol/g Hb auf 51 pmol/g Hb, d.h. um den Faktor 1,76, zu beobachten. Bei Proband 07 lässt sich eine leichte Verringerung des AAVal-Gehaltes in den Auswaschphasen zwischen dem Ende der jeweils vorangegangenen Studienperiode und dem Beginn der darauffolgenden Studienperiode feststellen. Der Biomarker GAVal lässt in den Perioden T2 und R einen tendenziell höheren Anstieg als in der Periode T1 erkennen. In der T2-Periode

steigt der durchschnittliche Gehalt an GAVal von 17 pmol/g Hb nach 0,5 h (pre ist ein Ausreißer) auf 25 pmol/g Hb, in der T1-Periode von 20 auf 23 pmol/g Hb nach 16 h (24 h ist ein Ausreißerwert) und in der Referenzperiode von 28 auf 35 pmol/g Hb. Über den gesamten Studienzeitraum steigt GAVal folglich von 17 auf 35 pmol/g Hb, d.h. um den Faktor 2.

In der Abbildung 42 ist der zeitliche Verlauf der Bildung von AAVal und GAVal unter Einbeziehung sämtlicher Zwischenmesspunkte dargestellt.

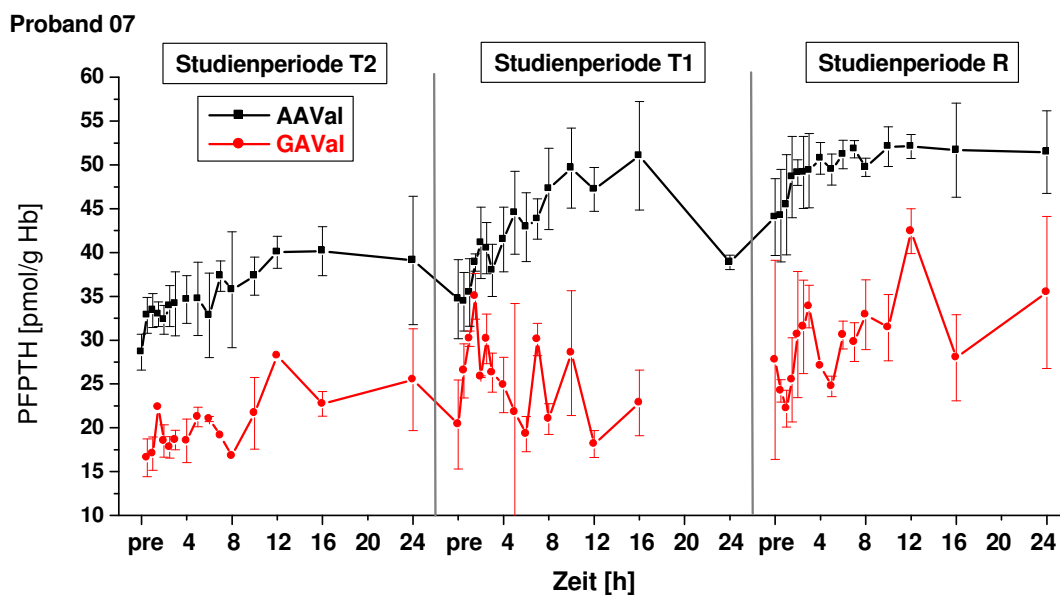


Abbildung 42: AAVal- und GAVal-Gehalte sämtlicher Messzeitpunkte von Proband 07 mittels GC/MS (zwischen den pre-Werten der jeweiligen Studienperioden liegen 2 Wochen)

Bei Betrachtung der Gesamtheit der Messzeitpunkte für diesen Probanden lässt sich der deutliche Anstieg des Biomarkers AAVal in der Studienperiode T1 erkennen. Wie bereits bei Proband 04 wird nach ungefähr 10-12 Stunden den Maximalwert für diese Studienperiode erreicht.

Proband 10

Die Gehalte von AAVal und GAVal für die Anfangs- und Endzeitpunkte aller drei Studienperioden bei Proband 10 sind in der Abbildung 43 gezeigt.

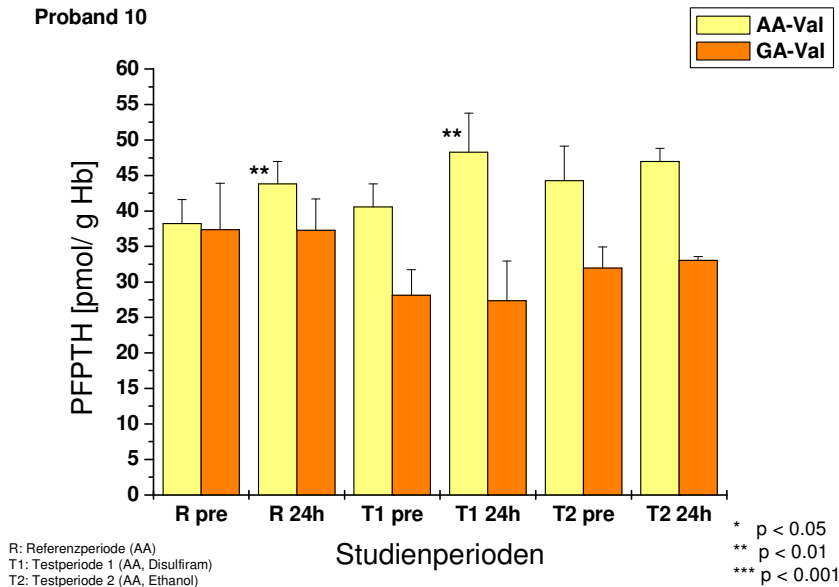


Abbildung 43: AAVal- und GAVal-Gehalte von Proband 10 vor Beginn und 24 Stunden nach Beginn der jeweiligen Studienperioden mittels GC/MS (zwischen den pre-Werten der jeweiligen Studienperioden liegen 2 Wochen)

Der Biomarker AAVal weist bei Proband 10 in den Studienperioden R und T1 einen statistisch signifikanten Anstieg auf. In der R-Periode steigt der durchschnittliche Gehalt an AAVal von 38 auf 44 pmol/g Hb ($p < 0.01$), in der T1-Periode von 41 auf 48 pmol/g Hb ($p < 0.01$) und in der T2-Periode von 44 auf 47 pmol/g Hb. Der Anstieg des AAVal-Gehaltes ist in der Periode T1 im Vergleich zu den anderen Studienperioden damit geringfügig stärker ausgeprägt. Über den gesamten Zeitraum der Studie betrachtet, ist ein Anstieg des AAVal-Gehaltes nach Gabe von insgesamt 3 mg Acrylamid von 38 pmol/g Hb auf 47 pmol/g Hb, d.h. um den Faktor 1,24, zu beobachten. Im Vergleich zu Proband 04 und 07 ist der Gesamtanstieg des Biomarkers AAVal deutlich geringer ausgeprägt. Wie bei Proband 07 lässt sich bei Proband 10 eine leichte Verringerung des AAVal-Gehaltes in den Auswaschphasen zwischen dem Ende der jeweils vorangegangenen Studienperiode und dem Beginn der darauffolgenden Studienperiode feststellen. Der Biomarker GAVal zeigt in den einzelnen Studienperioden keine Zunahme und scheint bezogen auf den gesamten Studienzeitraum sogar tendenziell abnehmende Werte aufzuweisen. In Anbetracht der hohen Messschwankungen kann davon ausgegangen werden, dass der Biomarker GAVal bei diesem Probanden nicht wesentlich beeinflusst wird.

In der Abbildung 44 ist der zeitliche Verlauf der Bildung von AAVal und GAVal unter Einbeziehung sämtlicher Zwischenmesspunkte dargestellt.

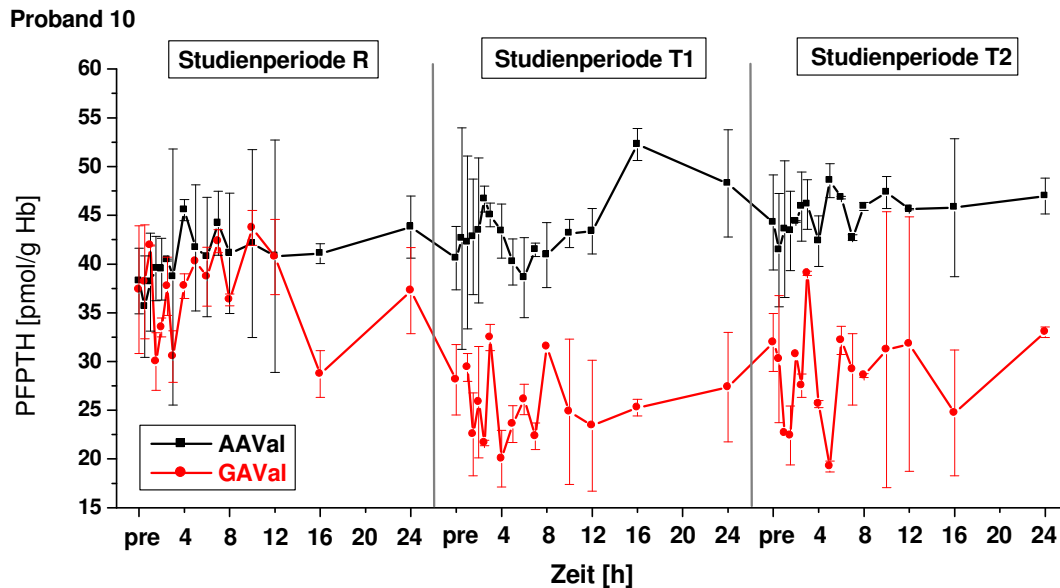


Abbildung 44: AAVal- und GAVal-Gehalte sämtlicher Messzeitpunkte von Proband 10 mittels GC/MS (zwischen den pre-Werten der jeweiligen Studienperioden liegen 2 Wochen)

Bei Betrachtung der Gesamtheit der Messzeitpunkte für diesen Probanden lässt sich ein Anstieg des Biomarkers AAVal in der Studienperiode T1 erkennen, der jedoch weniger deutlich ausgeprägt ist als bei den anderen beiden Probanden. Abweichend von diesen wird bei Proband 10 erst nach ungefähr 16 Stunden der Maximalwert für die Studienperiode T1 erreicht.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bei allen Probanden der Anstieg des Biomarkers AAVal in der Studienperiode T1 am deutlichsten ausgeprägt ist und in jedem Fall statistische Signifikanz aufweist. Diese Tendenz konnte bei der Messung der pre und 24 h-Messpunkte der übrigen 13 Probanden dieser Studie bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

5.6.2 Statistische Auswertung der Kinetik der *in vivo* Adduktbildung

Um sicher zu stellen, dass der bei der Betrachtung der Anfangs- und Endmesspunkte festgestellte statistisch signifikante Anstieg des Biomarkers AAVaI, insbesondere in der Studienperiode T1, auch den zeitlichen Verlauf der Adduktbildung widerspiegelt, wurden Konfidenzintervalle konstruiert, die Rückschlüsse auf eine statistische Signifikanz des Anstiegs über den gesamten Messzeitraum erlauben. Die weiteren Berechnungen beschränken sich auf den Biomarker AAVaI, da sich bei dem Biomarker GAVaI in den untersuchten Studienperioden keine statistisch signifikanten Erhöhungen des GAVaI-Gehaltes feststellen ließen. Die statistischen Auswertungen wurden mit Hilfe von Herrn Stockis (Fachbereich Mathematik, TU Kaiserslautern) durchgeführt. Abbildung 45 gibt eine Übersicht über die statistische Auswertung.

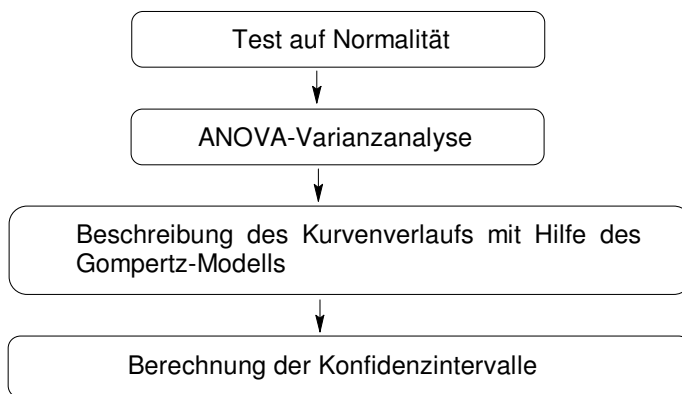


Abbildung 45: Schema der Vorgehensweise bei der statistischen Auswertung

5.6.2.1 Auswertung der pre- und 24 h-Werte

Bei der Prüfung der Normalverteilung der Messwerte für die Anfangs- und Endzeitpunkte der Studienphasen R, T1 und T2 kann für die überwiegende Mehrheit der Messwerte Normalität nicht abgelehnt werden (Tabelle 22).

Tabelle 22: Ergebnisse der Prüfung der Messwerte auf Normalität

Proband	Zeitpunkt	Tests auf Normalität		Normalität (Lilliefors / Shapiro-Francia)	weitere Tests
		p (Lilliefors)	p (Shapiro-Francia)		
04	R pre	0,4944	0,3871	+ / +	
	R 24h	--	--	--	
	T1 pre	--	--	--	
	T1 24h	0,8875	0,9948	+ / +	
	T2 pre	0,5095	0,2811	+ / +	
	T2 24h	--	--	--	
07	T2 pre	0,3928	0,5688	+ / +	
	T2 24h	0,03832	0,06607	- / +	Wilcoxon (*)
	T1 pre	0,248	0,3637	+ / +	
	T1 16+24h	0,5848	0,3884	+ / +	
	R pre	0,0959	0,1397	+ / +	
	R 24h	0,828	0,798	+ / +	
10	R pre	0,9372	0,971	+ / +	
	R 24h	0,1913	0,04435	+ / -	Wilcoxon (**)
	T1 pre	0,2119	0,2427	+ / +	
	T1 24h	0,3832	0,2868	+ / +	
	T2 pre	0,9742	0,998	+ / +	
	T2 24h	0,6371	0,4706	+ / +	
	T2 0,5h	0,9398	0,885	+ / +	
	T2 16h	0,1592	0,03488	+ / -	

* p < 0,05; ** p < 0,01; + Normalität; - keine Normalität; -- Test konnte nicht durchgeführt werden

Für die ANOVA-Varianzanalyse wurden folgende Faktoren abgeleitet:

Faktor 1: AAVal, GAVal (2 Levels)
 Faktor 2: Proband 4, Proband 7, Proband 10 (3 Levels)
 Faktor 3: pre, 24 h (2 Levels)
 Faktor 4: Studienphase R, T1, T2 (3 Levels)

Tabelle 23: Ergebnisse der ANOVA-Varianzanalyse

Faktoren	Df	F value	Pr (> F)	Sum sq	Mean sq	Signifikanzlevel
Fak 1	--	--	--	--	--	--
Fak 2	2	2,7542	0,06831	150,71	75,36	
Fak 3	1	70,3241	$2,623 \times 10^{-13}$	1924,15	1924,15	***
Fak 4	2	2,3016	0,10517	125,95	62,97	
Residuen	104			2845,56	27,36	

*** p < 0,001

Ein Vergleich der Faktoren untereinander lieferte die folgenden Daten:

Tabelle 24: Vergleich der Faktoren bei der ANOVA-Varianzanalyse

Faktoren	Estimate	Std. Error	t value	Pr (> t)	Signifikanzlevel
(Intercept)	0,8695	1,2620	0,689	0,49234	
Fak 2_2	- 1,7897	1,3005	- 1,376	0,17172	
Fak 2_3	- 3,4673	1,2727	- 2,724	0,00756	**
Fak 3_2	8,5097	1,0134	8,398	$2,47 \times 10^{-13}$	***
Fak 4_2	2,5791	1,2280	2,100	0,03813	*
Fak 4_3	0,7232	1,2086	0,598	0,55088	

* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001

→ Fak 2_1 = - Fak 2_2 - Fak 2_3 = 5,26

→ Fak 4_1 = - Fak 4_2 - Fak 4_3 = -3,29

Aus dem Vergleich der Faktoren untereinander kann ersehen werden, dass sich die Studienperiode T1 von den Studienperioden R und T2 unterscheidet (Tabelle 24). Die Zuwachsraten an AAVal steigen in der Reihenfolge T1 > T2 > R. Der Zuwachs an AAVal bei Proband 04 unterscheidet sich von den Probanden 07 und 10. Die Zuwachsraten an AAVal steigen in der Reihenfolge Proband 04 > 07 > 10.

5.6.2.2 Auswertung des Kurvenverlaufs

Zur mathematischen Beschreibung des zeitlichen Verlaufs der Adduktbildung von Acrylamid mit dem N-terminalen Valin des Hämoglobins wurde das Gompertz-Modell gewählt, das den als sigmoid angenommenen Verlauf der Adduktbildungskurve gut widerspiegelt. Die für die Testung der Algorithmen erforderlichen Schätzwerte für die Parameter α , β und k können mit Ausnahme der T1-Periode von Proband 10 erhalten werden (Tabelle 25).

Die Formel für das Gompertz-Modell wird durch Integration der Wachstumsrate

$$d\omega/dt = k \omega \log (\alpha/\omega) \text{ zu}$$

$$\omega = \alpha \cdot \exp \left\{ -\beta \cdot e^{-k \cdot t} \right\}$$

erhalten.

Tabelle 25: Schätzwerte der Parameter α , β und k für das Gompertz-Modell

Proband	Parameter	R-Periode		T1-Periode		T2-Periode	
		Schätz-wert	Std-Error	Schätz-wert	Std-Error	Schätz-wert	Std-Error
04	α	41.18	4.39	63.55	2.58	69.25	2.45
	β	0.40	0.13	0.58	0.06	0.16	0.04
	k	0.21	0.18	0.21	0.05	0.16	0.10
07	α	51.50	0.81	47.71	1.51	39.70	1.35
	β	0.16	0.03	0.34	0.04	0.27	0.04
	k	0.47	0.19	0.26	0.08	0.17	0.07
10	α	42.76	1.24	-	-	46.56	1.35
	β	0.15	0.05	-	-	0.08	0.04
	k	0.37	0.30	-	-	0.22	0.29

Die Bedingung $k - 2 \times \text{Standardfehler} > 0$ zur Erfassung von Unterschieden zwischen den pre- und 24h-Konfidenz-Intervallen ist beim Probanden 04 nur für die T1-Periode, beim Probanden 07 für die R-, T1- und T2-Periode und beim Probanden 10 in keinem Fall erfüllt. Für die genannten Datensätze wird durch Untersuchung der symmetrischen Eigenschaften der Residuen (α^{\wedge} , β^{\wedge} und k^{\wedge}) die Richtigkeit des Modells untersucht. Als Maß für „Goodness-of-fits“ wurde die folgende Gleichung verwendet:

$$\frac{SS_{\text{reg}}}{TSS} = \frac{\sum (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum (y_i - \bar{y})^2}$$

mit SS_{reg} : sum of squares due to regression, TSS: total sum of squares, y : Daten, \hat{y} : Schätzwerte

Dabei wurden relativ gute Werte für die T1 Perioden der Probanden 04 und 07 erhalten:

Proband 04, Studienperiode T1: 66 %
 Proband 07, Studienperiode R: 37 %
 Proband 07, Studienperiode T1: 57 %
 Proband 07, Studienperiode T2: 42 %

Die graphische Darstellung der Konstruktion der Residuen ist im Anhang dargestellt.

Für die Studienperiode T1 von Proband 04 sowie von sämtlichen Studienperioden von Proband 07 wurden die 95%- und 99%-Konfidenzintervalle berechnet. Es wurden die in Tabelle 26 aufgeführten Minimal- und Maximalwerte erhalten.

Tabelle 26: Minima und Maxima der 95%- und 99%-Konfidenzintervalle

Proband	Studienperiode	Zeitpunkt	95%-Konfidenzintervall		99%-Konfidenzintervall	
			Minimum	Maximum	Minimum	Maximum
04	T1	pre	29,00	43,38	27,23	45,98
		24 h	58,37	66,49	56,83	66,02
07	R	pre	40,03	48,06	38,93	49,39
		24 h	49,88	52,64	49,39	46,33
	T1	pre	29,36	39,12	28,09	40,78
		24 h	44,69	49,55	43,78	48,25
	T2	pre	26,07	35,06	24,90	36,60
		24 h	36,99	38,65	36,19	34,63

Im Idealfall sollen die Konfidenzintervalle für $t=0$ (rot gestrichelte Linien in Abbildung 46) und $t=24$ (blau gestrichelte Linien in Abbildung 46) disjunkt sein, d.h. die Konfidenzintervalle überlappen sich nicht, da der Maximalwert für $t=0$ kleiner als der Minimalwert für 24 h ist. Für das 95 %-Konfidenzintervall ist diese Bedingung für 04 T1, 07 R, 07 T1 und 07 T2 erfüllt. Für das 99 %-Konfidenzintervalls ist dies nur für 04 T1 und 07 T1 der Fall.

Der Bereich zwischen der Minimum- und der Maximumkurve ist der Bereich, in dem ein erwarteter Messwert mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 bzw. 99 % liegt. Es ist dabei zu beachten, dass die konstruierten Konfidenzintervalle keine Aussage über Ausreißerwerte zulassen, da das Rauschen außerhalb des Intervalls liegt. Folgende Graphiken dienen vorrangig einer Visualisierung der statistischen Signifikanz beim Anstieg des AAVal-Gehaltes.

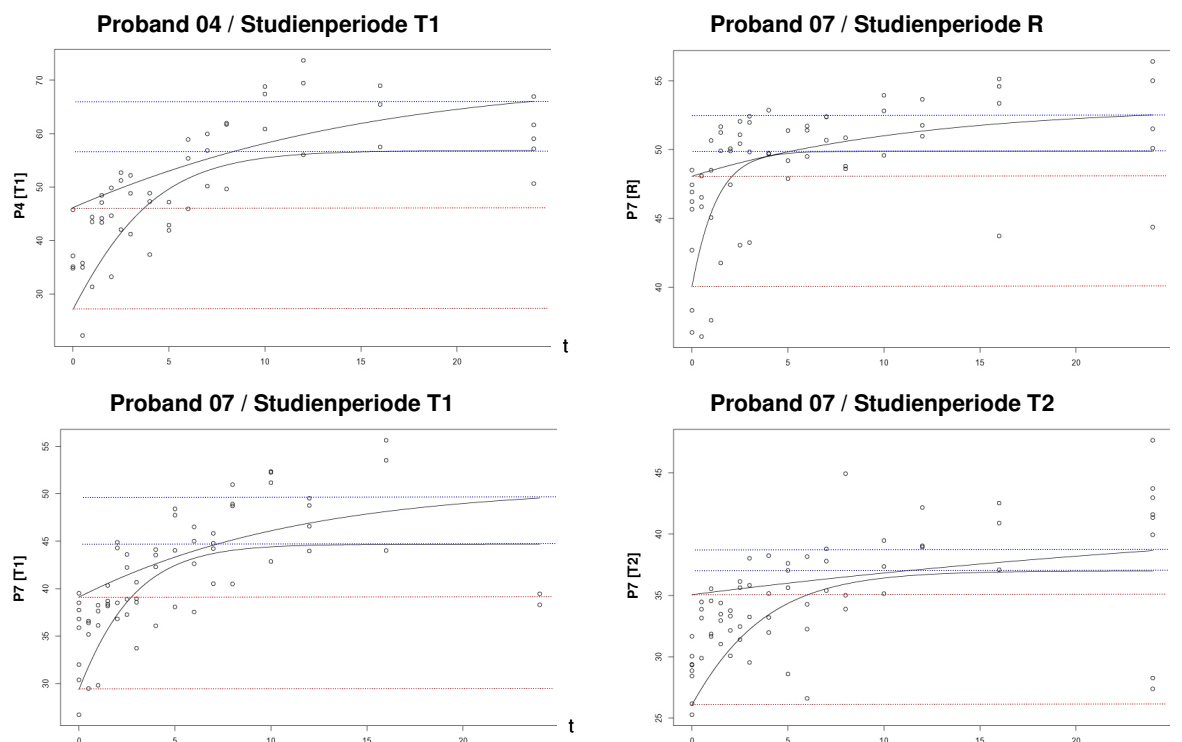


Abbildung 46: Graphische Darstellung der 95%-Konfidenzintervalle

Bei Betrachtung der 95 % Konfidenzintervalle der Versuchsperioden 04 T1, 07 R und 07 T1 in Abbildung 46 zeigt sich für den zeitlichen Verlauf der Reaktion von Acrylamid mit dem N-terminalen Valin des Hämoglobins ein statistisch signifikanter Anstieg des AAVal-Gehaltes ca. 3-4 Stunden nach oraler Gabe der Acrylamid-haltigen Kartoffelchips. In der Versuchsperiode 07 T2 erlangt der Anstieg des AAVal-Gehaltes erst nach ca. 6 Stunden statistische Signifikanz.

Um eine quantitative Aussage des AAVal-Anstiegs aus den gezeigten Konfidenzintervallen zu gewinnen, können die Differenzen der Mittelwerte der Anfangs- und Endzeitpunkte herangezogen werden. Bei einem Vergleich der beiden Versuchsperioden T1 von Proband 04 und 07 zeigt sich, dass der Zuwachs von 26 pmol/g Hb bei Proband 04 deutlich höher liegt als der Zuwachs von 13 pmol/g Hb bei Proband 07. Bei Proband 07 wird für die beiden anderen Versuchsperioden R und T2 mit jeweils 7 pmol/g Hb ein deutlich geringerer Zuwachs an AAVal als für T1 mit 13 pmol/g Hb gefunden.

Zusammenfassend betrachtet bestätigte die Berechnung der Konfidenzintervalle und die daraus abgeleiteten Rückschlüsse auf die statistische Signifikanz des Anstiegs vom Biomarker AAVal unter Berücksichtigung der Gesamtheit der Messwerte die

Beobachtung eines ausgeprägteren Anstiegs in der Studienperiode T1 bei zwei der Probanden (04 und 07).

5.7 Verteilung von ^{14}C -Acrylamid in humanem Vollblut

Die Untersuchung der Verteilung des ^{14}C -radiomarkierten Acrylamids in humanem Vollblut erfolgte mit der Zielsetzung die Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Bindung des Acrylamids an die Erythrozyten und Plasmaproteine zu erfassen. Humanes Vollblut wurde für 15 min, 1 h, 4 h und 6 h mit 3 bzw. 30 μM [2,3- ^{14}C]-Acrylamid inkubiert. Zunächst musste ein Versuchsdesign entworfen werden, das eine Auftrennung von geeigneten Mengen Vollblut in einzelne Fraktionen ermöglicht. Um eine ausreichende Genauigkeit zu erzielen, war es nötig, alle gewonnenen Fraktionen und Aliquots gravimetrisch zu erfassen und die während der Messung im Flüssigszintillationszähler auftretenden matrixspezifischen Quenchungen in der Auswertung zu berücksichtigen.

5.7.1 Einfluss der Matrix auf die Messergebnisse

Die Eigenfärbung der Matrix hat einen wesentlichen Einfluss auf die Intensität des Signals bei der Messung der Radioaktivität im Flüssigszintillationszähler und wurde aus diesem Grund bei allen Auswertungen berücksichtigt. Abbildung 47 zeigt die Quenchung des LSC-Messsignals für alle Blutfraktionen relativ zu der identischen Menge an Radioaktivität in Wasser beispielhaft für einen Probanden.

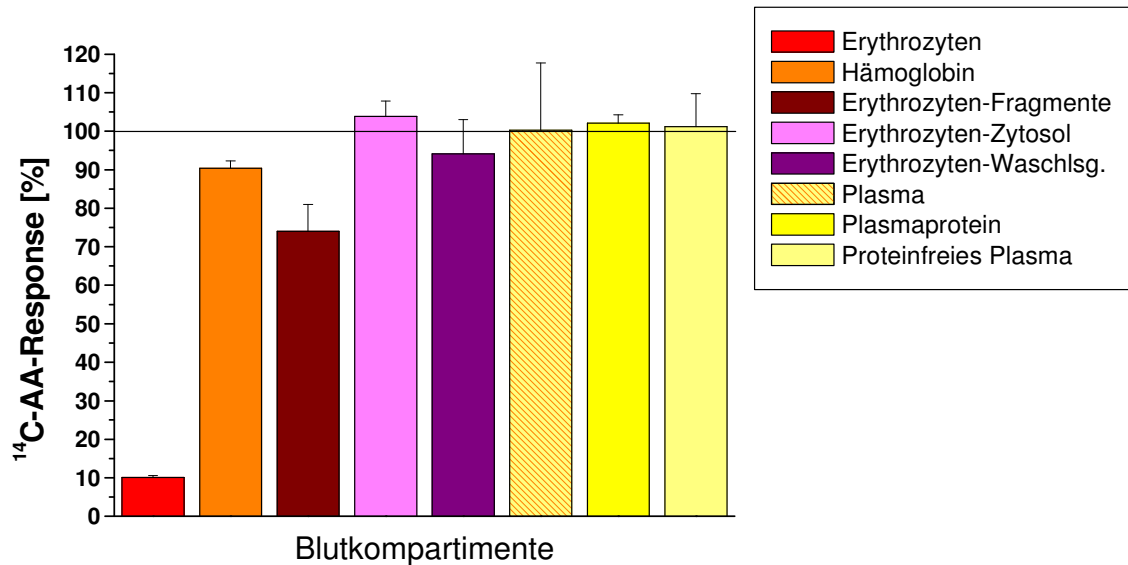


Abbildung 47: Quenchung des LSC-Messsignals in den verschiedenen Blutfraktionen nach der Zugabe einer identischen Menge ^{14}C -Radiomarkierung (9 nCi) relativ zu der entsprechenden Menge ^{14}C -Radiomarkierung in Wasser (100%-Linie)

Am deutlichsten ausgeprägt ist die Reduktion des LSC-Messsignals für die Erythrozyten-Fraktion, bei der die Wiederfindung der eingesetzten Menge an Radioaktivität nur 10% beträgt. Deutlich reduziert ist die Quenchung auch bei der ebenfalls eine starke Eigenfärbung aufweisenden Fraktion der Erythrozyten-Fragmente mit einer Wiederfindung von ca. 70%. Bei der Messung der Hämoglobin-Fraktion beträgt die Wiederfindungsrate 90%. Bei allen übrigen Blutfraktionen lässt sich keine wesentliche Beeinflussung der Messsignalintensität durch die jeweilige Matrix feststellen, so dass bei diesen Fraktionen keine Korrektur vorgenommen wurde.

5.7.2 Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der $^{14}\text{C-AA}$ -Verteilung in humanem Vollblut

Zur Untersuchung der Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der Verteilung von [2,3- ^{14}C]-Acrylamid in den einzelnen Blutkompartimente wurde die Erythrozytenfraktion nicht in weitere Unterfraktionen aufgetrennt. Die Auftrennung des inkubierten Blutes in verschiedene Blutkompartimente ist in der Abbildung 48 schematisch dargestellt:

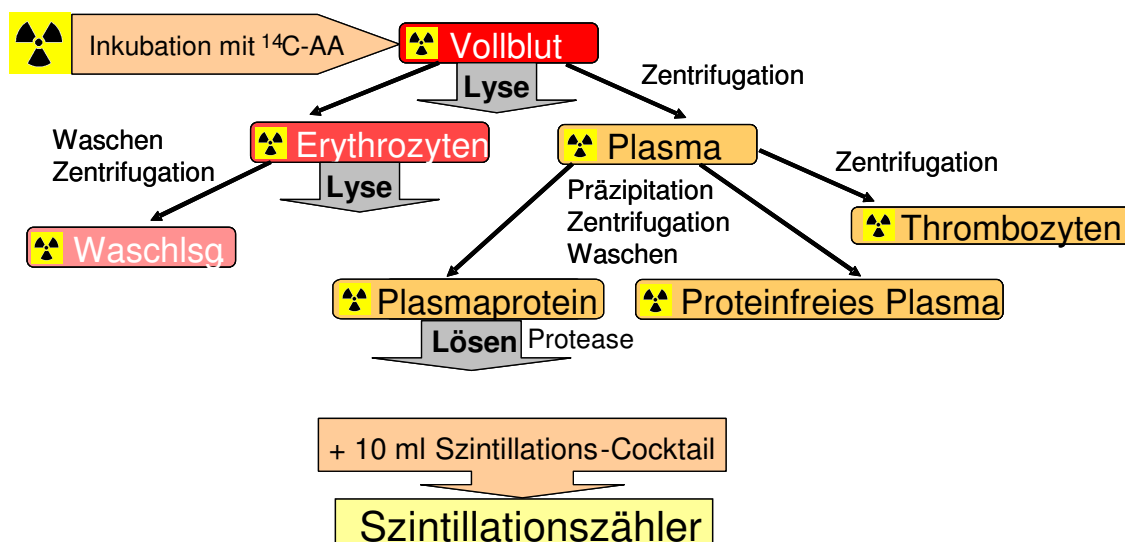


Abbildung 48: Übersicht der nach der Inkubation mit ^{14}C -AA generierten Blutfraktionen beim Versuchsdesign ohne weitere Fraktionierung der Erythrozytenfraktion

Die Ergebnisse sind im Folgenden für die Fraktionen Erythrozyten, proteinfreies Plasma, Plasmaprotein und Thrombozyten dargestellt. Der in der Fraktion der Erythrozyten-Waschlösung gemessene Anteil der Radioaktivität wird dem Plasma zugeordnet, da beim Waschen der Erythrozyten im Wesentlichen Plasmareste entfernt werden.

4.7.2.1 Versuche mit $3\ \mu\text{M}$ ^{14}C -Acrylamid

Für die Versuche, bei denen Inkubationen mit $3\ \mu\text{M}$ $[2,3-^{14}\text{C}]$ -Acrylamid durchgeführt wurden, verteilte sich die Radioaktivität wie in der Tabelle 27 angegeben.

Tabelle 27: Prozentuale Verteilung von $[2,3-^{14}\text{C}]$ -Acrylamid nach $3\ \mu\text{M}$ Inkubation

Zeitpunkt	n (unabh. Versuche)	Erythrozyten [%] [#]	Proteinfreies Plasma [%] [#]	Plasmaprotein [%] [#]	Thrombozyten [%] [#]
15 min	8	$38,69 \pm 3,03$	$45,93 \pm 3,54$	$10,87 \pm 1,74$	$0,82 \pm 0,25$
1 h	4	$36,04 \pm 3,33$	$45,97 \pm 2,96$	$11,92 \pm 1,32$	$0,61 \pm 0,10$
4 h	8	$41,07 \pm 3,96$	$45,01 \pm 3,63$	$11,08 \pm 0,99$	$0,55 \pm 0,06$
6 h	4	$51,93 \pm 6,22$	$29,59 \pm 1,14$	$12,69 \pm 1,18$	$0,71 \pm 0,09$

[#] % der Gesamtradioaktivität

Nach einer relativ kurzen Inkubationszeit von 15 Minuten befinden sich ungefähr 40% des ^{14}C -Acrylamids in der Erythrozytenfraktion und mehr als 55% im Plasma. Innerhalb des Plasmas verteilt sich die Radioaktivität zu ca. 75% auf das proteinfreie Plasma und zu ca. 20% auf das Plasmaprotein. In Bezug auf das Gesamtblut beträgt der Anteil an Radioaktivität im proteinfreien Plasma 45% und im Plasmaprotein 10%. Die Verteilung der Radioaktivität nach 1 h Inkubationszeit weist im Vergleich zu 15 min keine Veränderung auf. Nach 4 h ist ein geringer Anstieg der Radioaktivität in der Erythrozytenfraktion auf über 40% zu beobachten, der sich statistisch signifikant von dem Wert nach einstündiger Inkubation unterscheidet. Der Anteil des proteinfreien Plasmas beträgt jedoch wie bereits bei den kürzeren Inkubationszeiten ca. 45% von der Gesamtradioaktivität.

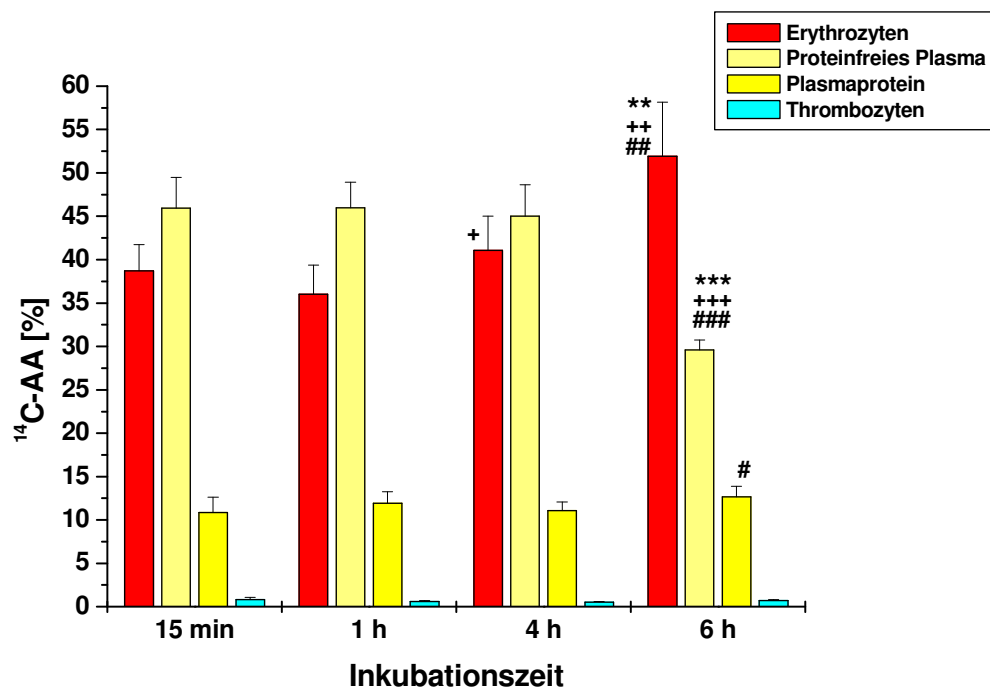


Abbildung 49: Prozentuale Verteilung von ^{14}C -Acrylamid nach 3 μM Inkubation;

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (relativ zum Zeitpunkt 15 min);
 + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$ (relativ zum Zeitpunkt 1 h);
 # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ (relativ zum Zeitpunkt 4 h).

Nach 6 h Inkubationszeit ist in Relation zu allen kürzeren Inkubationszeiten eine Verlagerung der Radioaktivität vom proteinfreien Plasma zu den Erythrozyten zu beobachten. Der Anteil des ^{14}C -AA steigt statistisch signifikant auf ungefähr 50% der Gesamtradioaktivität an. Gleichzeitig sinkt der Anteil der Radioaktivität im Proteinfreien Plasma auf ungefähr 30% ab. Zu diesem Zeitpunkt ist auch ein Anstieg

der Radioaktivität beim Plasmaprotein zu beobachten, der gegenüber 4 h statistisch signifikant ist.

Eine Isolierung der Thrombozyten ist unter den gegebenen Bedingungen nicht möglich. Auf Grund des Arbeitens im Mikromaßstab ist eine unzureichende Abtrennung der Thrombozyten und eine Vermischung mit Plasmaresten als sehr wahrscheinlich zu betrachten. Die erhaltenen Daten für dieses Kompartiment weisen darauf hin, dass der Anteil des $^{14}\text{C-AA} < 1\%$ beträgt.

4.7.2.2 Versuche mit $30\ \mu\text{M } ^{14}\text{C-Acrylamid}$

Für die identischen Inkubationszeiten wurden Versuche durchgeführt, bei denen mit $30\ \mu\text{M } [2,3-^{14}\text{C}]\text{-Acrylamid}$ inkubiert wurde. Im Vergleich zu den Inkubationen mit $3\ \mu\text{M}$ kann auf Grund der größeren Menge an eingesetzter Radioaktivität eine höhere Genauigkeit erwartet werden. Die Radioaktivität verteilte sich wie in Tabelle 28 angegeben.

Tabelle 28: Prozentuale Verteilung von $[2,3-^{14}\text{C}]\text{-Acrylamid}$ nach $30\ \mu\text{M}$ Inkubation

Zeitpunkt	n (unabh. Versuche)	Erythrozyten [%] [#]	Proteinfreies Plasma [%] [#]	Plasmaprotein [%] [#]	Thrombozyten [%] [#]
15 min	4	$30,57 \pm 4,05$	$51,89 \pm 3,95$	$12,48 \pm 1,49$	$0,96 \pm 0,07$
1 h	12	$37,38 \pm 2,18$	$56,51 \pm 1,64$	$9,43 \pm 0,73$	$0,69 \pm 0,15$
4 h	20	$44,65 \pm 5,08$	$41,69 \pm 6,27$	$11,93 \pm 3,74$	$0,62 \pm 0,18$
6 h	4	$36,74 \pm 1,74$	$46,45 \pm 1,93$	$13,36 \pm 0,5$	$0,61 \pm 0,06$

[#] % der Gesamtradioaktivität

Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten wurden ungefähr 30% des $^{14}\text{C-Acrylamids}$ in den Erythrozyten und ungefähr 65% im Plasma detektiert. Innerhalb des Plasmas verteilt sich die Radioaktivität zu ca. 75% auf das proteinfreie Plasma und zu ca. 20% auf das Plasmaprotein. Diese Verteilung wurde bereits bei der Inkubation mit $3\ \mu\text{M } ^{14}\text{C-AA}$ gefunden. In Bezug auf das Gesamtblut finden sich ca. 50% $^{14}\text{C-AA}$ im proteinfreien Plasma und ca. 12% im Plasmaprotein. Diese Werte sind etwas höher als bei Inkubation mit $3\ \mu\text{M } ^{14}\text{C-AA}$.

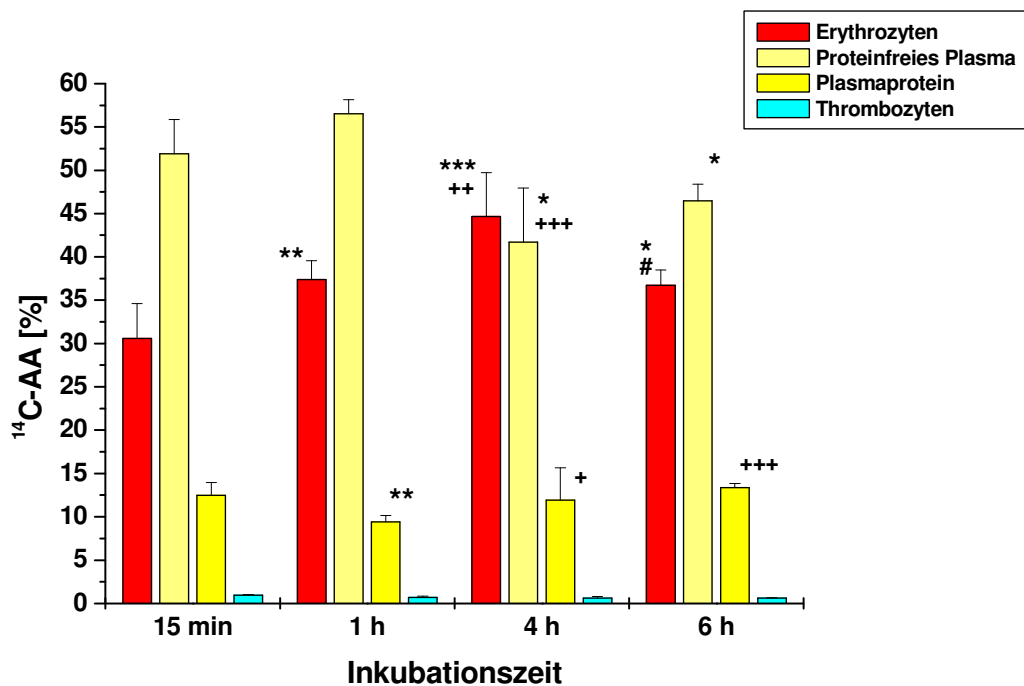


Abbildung 50: Prozentuale Verteilung von ^{14}C -Acrylamid nach 30 μM Inkubation;

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (relativ zum Zeitpunkt 15 min);
 + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$, +++ $p < 0,001$ (relativ zum Zeitpunkt 1 h);
 # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ (relativ zum Zeitpunkt 4 h).

Der Anteil der Radioaktivität in den Erythrozyten nimmt ausgehend von 15 Minuten bis zum Zeitpunkt 4 h statistisch signifikant von 30% auf ungefähr 45% zu. Der zu erwartende Abfall des $^{14}\text{C-AA}$ -Anteils im proteinfreien Plasma ist auf Grund des hohen Wertes für den Zeitpunkt 1 h nicht deutlich zu sehen. Dennoch ist die Abnahme der Radioaktivität im proteinfreien Plasma von ca. 57% auf ca. 42% nach 4 h statistisch signifikant ausgehend von den Zeitpunkten 15 min und 1 h. Im Plasmaprotein ist im Zeitraum von 1 h bis 6 h eine statistisch signifikante Zunahme der Radiomarkierung zu beobachten. Orientierende Versuche für den Zeitpunkt 6 h zeigen eine Abnahme der Radioaktivität in den Erythrozyten, die auf Grund der relativ langen Inkubationszeit auf Hämolyse zurückzuführen sein könnte.

Insgesamt lässt sich in den Verteilungsmustern der Radioaktivität nach Inkubation mit 3 und 30 μM ^{14}C -Acrylamid über den Zeitraum von 15 min bis 6 h der Trend einer Anreicherung der Radioaktivität in den Erythrozyten und einer Abreicherung im Proteinfreien Plasma erkennen. Eine Anreicherung der Radioaktivität im Plasmaprotein ist bei Inkubation mit 3 μM nur zwischen 4 und 6 h zu erkennen, bei Inkubation mit 30 μM zwischen 1 und 6 h deutlicher ausgeprägt.

5.7.3 Verteilung von ^{14}C -Acrylamid im Humanblut bei Auftrennung der Erythrozytenfraktion

Auf der Grundlage der Versuche im vorhergehenden Abschnitt wurde das Versuchsdesign der Verteilung von ^{14}C -Acrylamid im Humanblut um eine Auftrennung der Erythrozytenfraktion erweitert, um die Bindung an das Hämoglobin zu erfassen. Auf die nur bedingt mögliche Abtrennung der Thrombozyten wurde verzichtet. Die Auftrennung des inkubierten Blutes in eine größere Anzahl verschiedener Blutfraktionen ist in der Abbildung 51 schematisch dargestellt.

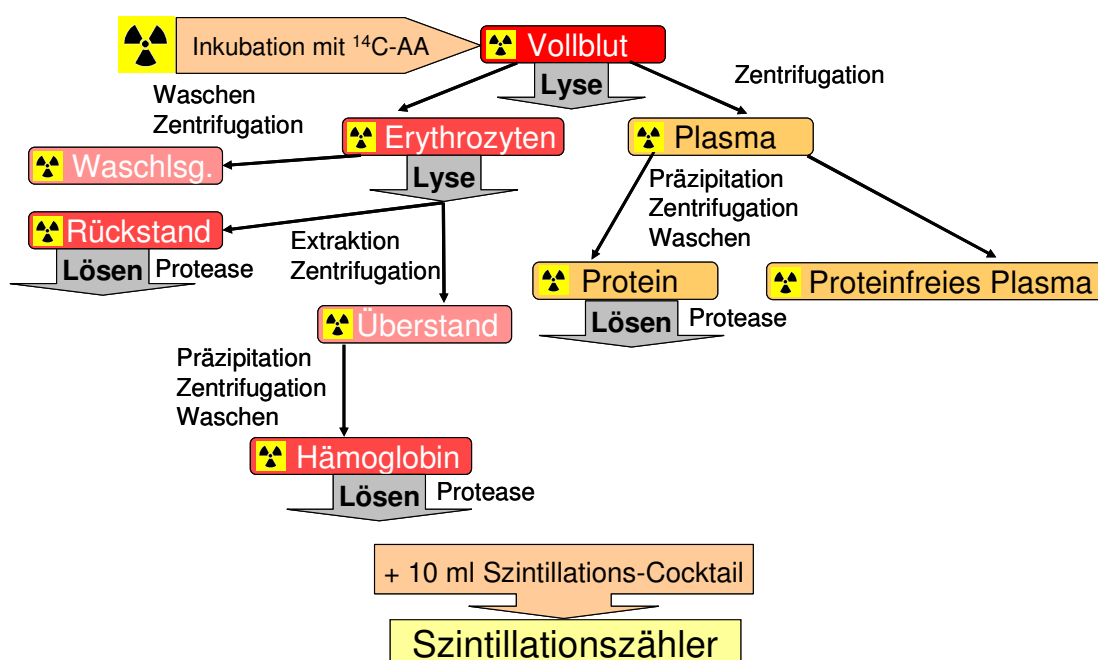


Abbildung 51: Übersicht der nach der Inkubation mit ^{14}C -AA generierten Blutfraktionen beim Versuchsdesign mit weiterer Fraktionierung der Erythrozytenfraktion

Nach vierstündiger Inkubation mit $30\ \mu\text{M}$ ^{14}C -Acrylamid verteilt sich die Radioaktivität in den Erythrozyten zu $15,97 \pm 6,67\%$ im Hämoglobin, zu $17,65 \pm 6,50\%$ in den Erythrozyten-Fragmenten und zu $39,17 \pm 3,12\%$ im Erythrozyten-Zytosol (Wiederfindung ca. 72,79%). Bezogen auf das Gesamtblut beträgt der prozentuale Anteil der Radioaktivität im Hämoglobin ca. 7%, in den Erythrozyten-Fragmenten ca. 8% und im Erythrozyten-Zytosol ca. 18%. Das Proteinfreie Plasma enthält ca. 39% und das Plasmaprotein ca. 14% der Radiomarkierung.

Tabelle 29: Prozentuale Verteilung von [2,3-¹⁴C]-Acrylamid nach 30 µM Inkubation (4 h)

n (unabh. Versuche)	Hämoglobin [%]	Erythrozyten-Zytosol [%]	Erythrozyten-Fragmente [%]	Proteinfreies Plasma [%]	Plasmaprotein [%]
12	7,41 ± 2,65	18,40 ± 1,04	8,23 ± 2,80	38,73 ± 5,13	13,82 ± 3,78

Die Verteilung der ¹⁴C-Radiomarkierung innerhalb der Erythrozytenfraktion zeigt, dass ungefähr 50% der Radiomarkierung gebunden an das Hämoglobin und die Erythrozyten-Fragmente vorliegt. Es ist davon auszugehen, dass der Anteil der an das Hämoglobin gebundenen Radioaktivität größer als hier angegeben ist, da die Fraktion der Erythrozyten-Fragmente mit großer Wahrscheinlichkeit Reste von Hämoglobin enthält, die auf eine unvollständige Extraktion des Hämoglobins zurückzuführen sind.

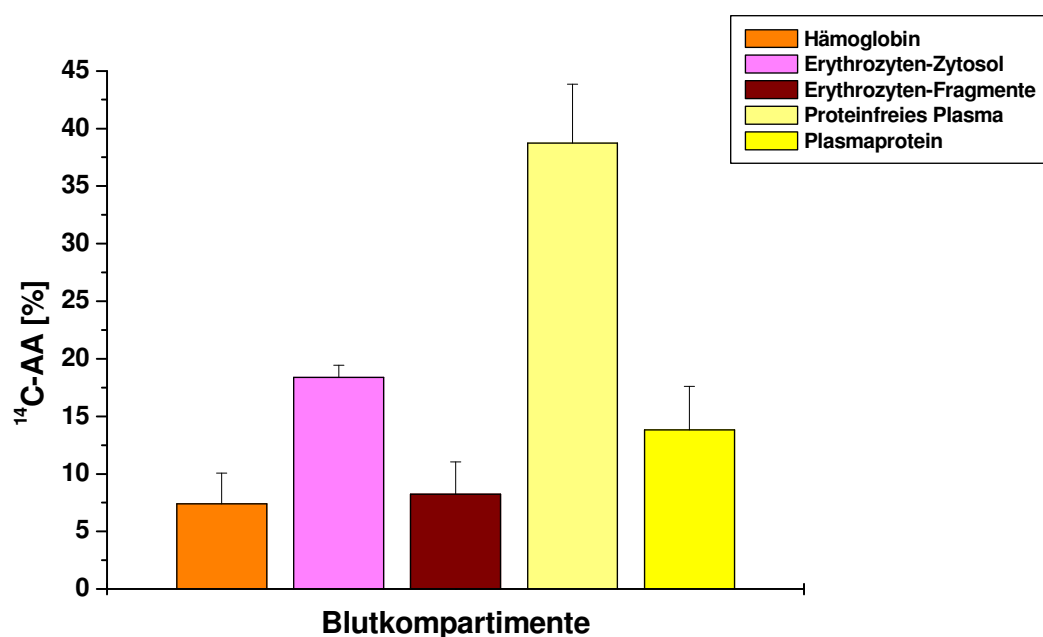


Abbildung 52: Prozentuale Verteilung der ¹⁴C-Radiomarkierung in humanem Vollblut nach 4 h Inkubation bei Auftrennung der Erythrozytenfraktion (n = 12)

Es können keine Rückschlüsse gezogen werden, in welcher Form das ¹⁴C-Acrylamid im Erythrozyten-Zytosol vorliegt. Aufgrund der dort vorhandenen hohen Konzentration von GSH ist ein Vorliegen als GSH-Addukt zumindest anteilig zu erwarten. Die Bindung des ¹⁴C-Acrylamids an das Plasmaprotein ist mit 11,2-18,2% höher als die Bindung an das Hämoglobin mit 5,8-10,4%.

6 Diskussion

Acrylamid, ein potentielles humanes Kanzerogen, das bei Erhitzungsprozessen in Lebensmitteln endogen aus Vorläuferverbindungen entsteht, reagiert auf Grund seiner elektrophilen Eigenschaften mit den nukleophilen Zentren von körpereigenen Makromolekülen wie Proteinen und der DNA. Die Bestimmung der Addukte von Acrylamid und seinem Metaboliten Glycidamid mit Blutproteinen, insbesondere Hämoglobin, findet seit einiger Zeit Anwendung beim Monitoring der humanen Exposition. Über den modifizierten Edman-Abbau kann das alkylierte N-terminale Valin des Hämoglobins analytisch erfasst werden.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, neue Erkenntnisse über die *in vitro* Kinetik der Adduktbildung von Acrylamid und seinem Metaboliten Glycidamid mit dem N-terminalen Valin des Hämoglobins in humanem Vollblut mittels chromatographisch-massenspektrometrischer Methoden zu gewinnen und diese mit dem Potential von Acrylamid und Glycidamid zur Induktion genotoxischer Effekten in Beziehung zu setzen. Die *in vivo* Kinetik der Hämoglobin-Adduktbildung im Menschen wurde im Rahmen einer Acrylamid-Verzehrsstudie an drei ausgewählten Probanden untersucht. Die Verteilung und Bindung von Acrylamid im gesamten Kompartiment Humanblut wurde mit ^{14}C -radiomarkiertem Material in weiteren *in vitro* Versuchen aufgezeigt.

6.1 Etablierung von Methoden zur Messung der Adduktbildung von Acrylamid und Glycidamid am N-terminalen Valin des Hämoglobins

Die quantitative Erfassung der Hämoglobinaddukte erforderte zunächst die Etablierung geeigneter LC/MS/MS- sowie GC/MS-Methoden und die Synthese der zur Quantifizierung benötigten Referenzsubstanzen. Es wurden in Anlehnung an eine Vielzahl von Publikationen AAd₇Val-PFPTH (N-(2-Aminocarbonylethyl)-(S)-5-d₇-isopropyl-3-pentafluorophenyl-2-thiohydantoin) und GAd₇Val-PFPTH (N-(2-Aminocarbonyl-2-hydroxyethyl)-(S)-5-d₇-isopropyl-3-pentafluorophenyl-2-thiohydantoin) zur internen Kalibrierung verwendet [Bergmark, 1997, Fennell *et al.*, 2005, Hagmar *et al.*, 2001, Paulsson *et al.*, 2003a, Paulsson *et al.*, 2006, Perez *et al.*, 1999].

Die etablierten LC/MS/MS- und GC/MS-Methoden wiesen im jeweils untersuchten Messbereich Linearität auf. Mit der LC/MS/MS-Methode, wurden für die PFPTH-Standardsubstanzen Bestimmungsgrenzen im nanomolaren Bereich erreicht. Trotz der durch die MS/MS-Technik ermöglichten Ausblendung der biologischen Matrix in

den untersuchten Blutproben und der dadurch hohen Selektivität, reichte die Sensitivität des verwendeten Geräts nicht aus, um die Hintergrundadduktgehalte an AAVal und GAVal in Blutproben der allgemeinen Bevölkerung im Bereich von 5-100 pmol/g Hb zu detektieren.

Mit der GC/MS-Methode hingegen wurden für die PFPTH-Standardsubstanzen Bestimmungsgrenzen im picomolaren Bereich erhalten und damit die Bestimmung der Hintergrundgehalte an Acrylamid- und Glycidamidaddukten ermöglicht. Um den Einfluss der Probenmatrix bei der Charakterisierung der Methode sowie die immer im Chromatogramm vorhandenen Hintergrundlevel zu berücksichtigen, wurden die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen der Analyte AAVal-PFPTH und acGAVal-PFPTH mit Hilfe eines Additionsverfahrens in aufgearbeitetem Humanblut ermittelt. Die mit Hilfe des DIN 32645 Verfahrens berechneten Bestimmungsgrenzen betrugen 0,9 pmol/g Hb für AAVal-PFPTH und 2,3 pmol/g Hb für acGAVal-PFPTH. Vergleichbare Werte mit 0,5 pmol/g Hb als Detektionsgrenze für AAVal-PFPTH fanden beispielsweise Fennell *et al.* [Fennell *et al.*, 2003], 4 pmol/g Hb als Detektionsgrenze für AAVal-PFPTH und acGAVal-PFPTH wurde von Schettgen *et al.* angegeben [Schettgen *et al.*, 2004b]. Aufgrund verschiedener möglicher Verfahren zur Ermittlung von Nachweis- und Bestimmungsgrenzen sowie methodischer oder gerätetechnischer Unterschiede, ist ein direkter Vergleich der Methoden untereinander jedoch schwierig.

Die in den erhaltenen Chromatogrammen abgebildete biologische Probenmatrix stellte ein wesentliches Problem für die Quantifizierung der Analyte dar, insbesondere für GAVal, bedingt durch das Auftreten von GAVal-PFPTH als Doppelsignal und der damit verbundenen relativen Flächenabnahme im Vergleich zu einem einzigen Signal. In der Literatur wird das chromatographische Erscheinungsbild als Doppelsignal mit dem Vorliegen von GAVal-PFPTH als Diastereomerenpaar, basierend auf den zwei asymmetrischen C-Atomen im Molekül, gedeutet [Calleman *et al.*, 1990, Paulsson *et al.*, 2003a, Schettgen *et al.*, 2004b]. Diastereomerenpaare sind auch von PFPTH-Derivaten anderer Epoxide wie z.B. Ethylenoxid, Propylenoxid oder Styroloxid bekannt [Tornqvist, 1994]. Die zusätzliche Bildung des Regioisomers N-(1-Aminocarbonyl-2-hydroxyethyl)-Valin wäre zwar eine weitere denkbare Erklärung für das chromatographische Erscheinungsbild eines Doppelpeaks (bestehend aus zwei Regioisomeren), jedoch wurde das resultierende PFPTH-Derivat bei bisherigen Untersuchungen nicht nachgewiesen, was darauf hindeutet, dass N-(2-Aminocarbonyl-2-hydroxyethyl)-Valin, das Reaktionsprodukt des N-terminalen Valins im Hämoglobin mit dem sterisch leichter zugänglichen C-3-Atom

des Glycidamids, bevorzugt gebildet wird [Paulsson *et al.*, 2003a, Sumner *et al.*, 1999]. Entsprechendes gilt für die Reaktion des Glycidamids mit Cysteinresten im Hämoglobin, bei dem ebenfalls ausschließlich das Regioisomer S-(2-aminocarbonyl-2-hydroxyethyl)-Cystein nachgewiesen wurde [Calleman *et al.*, 1990]. In Bezug auf eine mögliche Acetonisierung des N-(1-Aminocarbonyl-2-hydroxyethyl)-valyl-PFPTH wird nach Paulsson *et al.* die Bildung eines in diesem Fall erforderlichen Sechseringes gegenüber eines Fünferinges energetisch nicht favorisiert [Paulsson *et al.*, 2003a]. Die Tatsache dass auch nach der Acetonisierung ein Doppelpeak mit gleichem Peakverhältnis (ca. 2:3) erhalten wird, ist ein weiteres Indiz für das Vorliegen eines Diastereomerenpaares von N-(2-Aminocarbonyl-2-hydroxyethyl)-valyl-PFPTH, da von einer ähnlich verlaufenden Acetonisierung beider Stereoisomere ausgegangen werden kann. Aufgrund häufiger chromatographischer Interferenzen des zuerst eluierenden kleineren Peaks von acGAVal-PFPTH durch Bestandteile der biologischen Probenmatrix, kann jedoch nur der verbleibende größere Peak zur Quantifizierung des GAVal-Gehaltes herangezogen werden. Da sich das Peakverhältnis des Diastereomerenpaares von acGAVal-PFPTH als konstant erwiesen hat und auch nur das entsprechende später eluierende Diastereomer des internen Standards acGAd₇Val-PFPTH berücksichtigt wird, ist keine Beeinflussung des Ergebnisses durch diese Vorgehensweise zu erwarten. Das Flächenverhältnis der beiden Signale von ca. 2:3 wird auch von Schettgen *et al.* gezeigt, bei deren Methode die beiden Peaks Retentionszeiten von 17.10 und 17.17 Minuten aufweisen [Schettgen *et al.*, 2004b]. Der Abstand der beiden Signale entspricht damit der in dieser Arbeit verwendeten Methode, bei der die entsprechenden Retentionszeiten bei 18.27 und 18.35 Minuten liegen.

Der Versuch, die biologische Matrix durch eine Wasserdampfdestillation der Probe zu reduzieren, gelingt nicht, da die Pentafluorphenylthiohydantoin-Derivate keine ausreichende Wasserdampflichkeit aufweisen. Auch das Einfügen eines weiteren Waschschrittes der in Toluol gelösten Probe sowie die Anwendung einer Flüssig-Flüssig-Extraktion an Diatomeenerde (XTR[®]) anstelle einer konventionellen Flüssig-Flüssig-Extraktion resultieren in keiner sichtbaren Reduktion der Probenmatrix. Die Flüssig-Fest-Extraktion an SPE-Festphasen (SiOH, C18, C18e) ist auf Grund der hohen Viskosität der in Formamid vorliegenden Hämoglobin-Matrix schwierig und führt zu sehr geringen Wiederfindungsraten (< 0,1 %), so dass von einer weiteren Anwendung abgesehen wurde. Vesper *et al.* gelang die Anwendung einer Flüssig-Flüssig-Extraktion an Diatomeenerde für die automatisierte Bestimmung der Hb-Addukte von Acrylamid und Glycidamid, mit einer sich anschließenden LC/MS/MS-

Analytik [Vesper *et al.*, 2006]. Eine wesentliche Verringerung der biologischen Probenmatrix ist grundsätzlich bei der Verwendung eines GC/MS/MS-Gerätes sowie eines ausreichend sensitiven LC/MS/MS-Gerätes zu erreichen, wie dies bereits in der Literatur gezeigt wurde [Bergmark, 1997, Fennell *et al.*, 2003, Paulsson *et al.*, 2003a, Paulsson *et al.*, 2006, Tareke *et al.*, 2006, Vesper *et al.*, 2006].

6.2 Untersuchungen zur Hintergrundbelastung von Rauchern und Nichtrauchern durch Acrylamid und Glycidamid in Form von Hämoglobinaddukten

Es wurden im Rahmen dieser Arbeit die im Blut von Nichtrauchern und Rauchern vorhandenen Gehalte der Hämoglobinaddukte AAVal und GAVal (sog. Hintergrundbelastung) bestimmt. Die Nichtraucher ($n = 20$) wiesen einen durchschnittlichen AAVal-Adduktgehalt von $37,2 \pm 7,5$ pmol/g Hb und einen durchschnittlichen GAVal-Adduktgehalt von $21,3 \pm 12,6$ pmol/g Hb auf (s. Abbildung 29). In früheren Arbeiten zur Hintergrundbelastung der Allgemeinbevölkerung wurden Adduktgehalte in derselben Größenordnung beschrieben, so Paulsson *et al.* mit 27 ± 6 pmol/g Hb für AAVal und 26 ± 6 pmol/g Hb für GAVal [Paulsson *et al.*, 2003a], Schettgen *et al.* mit 19 pmol/g Hb für AAVal und 17 pmol/g Hb für GAVal [Schettgen *et al.*, 2004b], Bader mit 16 ± 8 pmol/g Hb für AAVal [Bader, 2005], Scherer *et al.* mit $27,8 \pm 7,1$ pmol/g Hb für AAVal [Scherer *et al.*, 2007] oder Vesper *et al.* mit 129 pmol/g Hb für AAVal und 97 pmol/g Hb für GAVal [Vesper *et al.*, 2006], wobei der zuletzt genannten Publikation keine Information zu dem Raucherstatus der Spender entnommen werden kann. Für Raucher finden sich tendenziell höhere AAVal- und GAVal-Werte als für Nichtraucher, so bei Schettgen *et al.* mit 80 pmol/g Hb für AAVal und 53 pmol/g Hb für GAVal [Schettgen *et al.*, 2004b], Bader *et al.* mit 60 ± 56 pmol/g für AAVal [Bader, 2005] oder Scherer *et al.* mit $84,1 \pm 41,8$ pmol/g Hb für AAVal [Scherer *et al.*, 2007]. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Raucher ($n = 4$) zeigten ein heterogeneres Bild in Bezug auf ihre Hämoglobinadduktgehalte (s. Abbildung 30). Drei der vier untersuchten Spender wiesen einen durchschnittlichen AAVal-Gehalt von $90,6 \pm 48,7$ pmol/g Hb auf, das damit deutlich höher liegt als bei den nichtrauchenden Spendern. Ein weiterer Spender zeigte sogar einen AAVal-Gehalt von 858 pmol/g Hb und einen GAVal-Gehalt von 211 pmol/g Hb. Es ist beschrieben, dass derart hohe Biomarker-Gehalte bereits mit neurotoxischen Wirkungen assoziiert sein könnten [Hagmar *et al.*, 2001]. Aufgrund der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sowie der Tatsache, dass der betreffende

Spender ebenfalls sehr hohe AAMA und GAMA-Werte aufwies (Daten nicht gezeigt), wurde ein Messfehler bzw. eine Artefaktbildung als Ursache ausgeschlossen. In der Literatur lassen sich annähernd hohe AAVal-Werte für Einzelpersonen finden. So findet sich bei Vesper et al. ein maximaler AAVal-Gehalt von 453 pmol/g Hb und ein maximaler GAVal-Gehalt von 240 pmol/g Hb [Vesper et al., 2006]. Fennell et al. fanden im Rahmen einer Humanverzehrstudie für einen Nichtraucher einen Einzelmesswert von 986 pmol/g Hb, für den die Autoren keine Erklärung fanden [Fennell et al., 2005]. Darüber ob sich derart hohe Biomarkerwerte allein auf einen hohen Tabakkonsum zurückführen lassen oder ob auch physiologische Besonderheiten (z.B. Geschwindigkeit der Metabolisierung) eine Rolle spielen, lässt sich nur spekulieren. Da neben den erhöhten AAVal-Gehalten auch deutlich erhöhte GAVal-Gehalte gefunden werden, ist vermutlich die Acrylamidaufnahme der entscheidende Faktor. Eine möglicherweise endogene Bildung von Acrylamid im Menschen wurde diskutiert, aber falls überhaupt vorhanden, als quantitativ unbedeutend bewertet [Umweltbundesamt, 2008]. Die relativ großen Schwankungen im GAVal/AAVal-Verhältnis bei den einzelnen Spendern (0,16-1,03) wurden auch in anderen Studien beobachtet. So fanden Vesper et al. sogar GAVal/AAVal-Verhältnisse im Variationsbereich von 0,33-3,12 [Vesper et al., 2006].

Neben der zu Beginn dieses Kapitels diskutierten Kalibrierung unter Verwendung deuterierter Pentafluorphenylthiohydantoin-Standards wurden für einige der Publikationen zur Hintergrundbelastung der allgemeinen Bevölkerung mit Acrylamid und Glycidamid auch modifizierte Peptid-Standards verwendet. Diese Art der Kalibrierung hat den Vorteil, dass auch der interne Standard den Schritt der Abspaltung des alkylierten Valins bei der Umwandlung zu dem entsprechenden PFPTH-Derivat durchlaufen muss und die Ausbeute dieser Reaktion somit bei der Quantifizierung Berücksichtigung findet. Die von Schettgen et al. verwendeten Dipeptidstandards (N-2-Carbamoyl-ethylvalyl-leucin-anilid, N-(R,S)-2-Hydroxy-2-carbamoyl-ethylvalyl-leucin-anilid) verursachten jedoch Probleme bei der Detektion mittels GC/MS im negativen CI-Modus, weshalb auf eine externe Kalibrierung zurückgegriffen werden musste [Schettgen et al., 2004b]. Vesper et al. verwendeten die Oktapeptide AA-Val(¹³C₅¹⁵N)-HLTPEEK und GA-Val(¹³C₅¹⁵N)-HLTPEEK, welche eine dem Hämoglobin entsprechende Aminosäuresequenz aufweisen. In der Humanverzehrstudie mit 6 Probanden ergaben sich mit dieser Kalibrierung Hintergrundadduktlevel von 34-46 pmol AAVal/g Hb und 17-31 pmol GAVal/g Hb [Vesper et al., 2005]. Diese Ergebnisse weichen nicht wesentlich von Studien ab, bei denen mit Zugabe der isotoopenmarkierten PFPTH-Derivate kalibriert wurde, so dass

von einer nahezu vollständigen Abspaltung des alkylierten Valins durch PFPITC ausgegangen werden kann. Dahingegen werden in einer weiteren Publikation der Arbeitsgruppe um Vesper unter Verwendung der Oktapeptidstandards bei 96 Probanden Hintergrundadduktlevel von 27-453 pmol AAVal/g Hb (Median 129) und 27-240 pmol GAVal/g Hb (Median 97) angegeben [Vesper *et al.*, 2006]. Derart hohe Adduktgehalte könnten zum einen darauf hindeuten, dass die bislang mit PFPTH-Kalibrierung erhaltenen Hintergrundadduktgehalte zu niedrig waren und die Verwendung der Oktapeptide exaktere Werte liefert. In der Publikation finden sich jedoch keine Informationen über den Raucherstatus der Probanden, so dass der Einfluss der Kalibrierung mit Oktapeptiden auf die Hintergrundadduktgehalte nicht eindeutig abgeleitet werden kann. Tareke *et al.* glichen ihre auf PFPTH basierende Kalibrierung mit einer Kalibrierung unter Verwendung von Dipeptiden und Oktapeptiden ab. Dadurch konnten sie bei Verwendung der Oktapeptide Effizienzen für die Derivatisierungsreaktion von $42 \pm 2 \%$ für AAVal und $40 \pm 5 \%$ für GAVal und bei Verwendung der Dipeptide von $47 \pm 5 \%$ für AAVal und $81 \pm 11 \%$ für GAVal berechnen. Der Einsatz der Oktapeptide wurde auf Grund ihrer größeren Ähnlichkeit mit dem N-Terminus des humanen Hämoglobins sowie der geringeren Variabilität im Vergleich zur Verwendung der Dipeptide als die geeignetere Form der Kalibrierung betrachtet [Tareke *et al.*, 2006].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Dipeptidstandards N-2-Aminocarbonylethyl-d₈valyl-leucin-p-nitroanilid und N-(*R,S*)-2-Aminocarbonyl-2-hydroxyethyl-d₈valyl-leucin-p-nitroanilid synthetisiert und für einen exemplarischen Vergleich mit der Kalibrierung mit PFPTH-Standardsubstanzen verwendet. Dabei zeigte sich bei Verwendung des AAd₈Dipeptids einen dreimal größeren AAVal-Adduktgehalt als mit PFPTH-Kalibrierung. Bei Verwendung des GAd₈Dipeptids lieferte diese Art der Kalibrierung viermal höhere Gehalte als die PFPTH-Kalibrierung. Auf Grund der Unsicherheiten bei der Charakterisierung der Dipeptide und einer fehlenden Methode zu ihrer weiteren Aufreinigung sind die mit diesen Standardsubstanzen erhaltenen Ergebnisse nur dazu geeignet, die Tendenz höherer Adduktgehalte bei Verwendung von Peptidstandards festzustellen. Die Quantifizierungen im Rahmen dieser Arbeit erfolgten deshalb weiterhin auf der Basis der PFPTH-Kalibrierung.

6.3 Betrachtung der Dosimetrie der Adduktbildung von Acrylamid und Glycidamid am N-terminalen Valin des Hämoglobins unter Berücksichtigung des genotoxischen Potentials

Das genotoxische Potential von Acrylamid beruht im Wesentlichen auf seinem Metaboliten Glycidamid, da dieses nachweislich DNA-Addukte erzeugt, vor allem N7-GA-Guanin [Doerge *et al.*, 2005a, Gamboa da Costa *et al.*, 2003, Maniere *et al.*, 2005].

Im Rahmen des FEI-Projektes „Acrylamid in Lebensmitteln – Strategien zur Minimierung“ wurde mit Hilfe des Comet Assays (Einzelzellgelelektrophorese) gezeigt, dass nach vierstündiger Inkubation von humanem Vollblut mit Acrylamid in Konzentrationen von bis zu 6 mM keine Strangbrüche in der Lymphozyten-DNA auftraten, während Glycidamid unter den gleichen Bedingungen ab Konzentrationen von 300 μ M genotoxisch wirkte [Baum *et al.*, 2005]. Die Sensitivität des Comet Assays lässt sich durch eine zusätzliche Behandlung der Zellen mit dem DNA-Base-Excision Repairenzym FPG deutlich erhöhen. FPG erkennt verschiedene Arten von DNA-Schäden, wie oxidierte Purinbasen und daraus resultierende ring-geöffnete Formamido-pyrimidine/Imidazole (FaPy), allerdings auch alkylierte FaPy, welche aus einem entsprechenden DNA Addukt gebildet wurden und entfernt diese aus der DNA unter Einführung eines zusätzlichen Strangbruchs. Unter Anwendung dieser Methodik induzierte Glycidamid nach ebenfalls vierstündiger Inkubation bereits DNA-Strangbrüche ab 10 μ M [Thielen, 2008, Thielen *et al.*, 2006]. Lymphozyten-DNA wurde gewählt, da Blut das erste Kompartiment ist, mit dem Acrylamid nach einer Aufnahme in den Körper in Kontakt kommt. Die Untersuchung des Blutes bietet ferner die Möglichkeit zu untersuchen, ob in dem Konzentrationsbereich einer beginnenden Genotoxizität von Glycidamid auch eine effektive Bindung an Proteinbestandteile des Blutes stattfindet. Bei der Inkubation von Humanblut mit 0,3, 3 und 10 μ M Acrylamid bzw. Glycidamid, wurde nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden, und einer Konzentration von 3 μ M Glycidamid, eine statistisch signifikante Zunahme des GAVal-Gehaltes um 41 pmol/g Hb gemessen ($p < 0,01$) (s. Abbildung 36). Bei dieser Konzentration wurde eine statistisch signifikante Zunahme des GAVal-Gehaltes um 12 pmol/g Hb auch bereits nach einer einstündigen Inkubation beobachtet ($p < 0,05$) (s. Abbildung 36). Unter der Voraussetzung, dass der Comet Assay und die Bestimmung der Hb-Addukte mittels modifiziertem Edman-Abbau eine vergleichbare Sensitivität aufweisen, zeigt sich, dass die Adduktbildung von Glycidamid am N-terminalen Valin des Hämoglobin bereits in einem

Konzentrationsbereich beginnt, in dem noch keine Strangbrüche in der Lymphozyten-DNA zu beobachten sind. Die Adduktbildung von Elektrophilen wie Acrylamid oder Glycidamid an das Hämoglobin oder Albumin im Blut verursacht keine toxikologisch relevante Beeinträchtigung der Funktionalität dieser Proteine und besitzt somit eine gewisse Schutzfunktion hinsichtlich der als deutlich kritischer zu betrachtenden Reaktion der Elektrophile mit der DNA [Eisenbrand und Metzler, 2002]. Bei Konzentrationen, bei denen DNA-Strangbrüche durch Glycidamid detektiert werden können (ab 10 μM Glycidamid), ist bereits eine Adduktbildung am N-terminalen Valin des Hämoglobins feststellbar (ab 3 μM Glycidamid). Auch wenn der Abstand dieser Konzentrationen als relativ gering anzusehen ist, ist es denkbar, dass die Proteinadduktbildung im Blut einen gewissen Schutz gegenüber der genotoxischen Aktivität des Glycidamids darstellt. Bei dieser Interpretation ist jedoch zu beachten, dass die in diesen Versuchen gewählten Bedingungen (kurze Inkubationszeit, hohe Konzentrationen) nicht den in der Realität vorherrschenden Bedingungen der humanen Exposition des Menschen mit Acrylamid bzw. Glycidamid entsprechen (längere Exposition, niedrigere Konzentrationen). In Bezug auf die physiologisch zu erwartende Exposition könnte die Bindung an Proteine, in diesem Experiment repräsentiert durch die gemessene Bindung an das N-terminale Valin des Hämoglobins, neben der Konjugation mit GSH durchaus eine relevante Schutzfunktion ausüben. Diese Überlegung wird durch die Tatsache unterstützt, dass beim Menschen bislang keine GA-DNA-Addukte nachgewiesen wurden [Umweltbundesamt, 2008].

6.4 Effizienz der Adduktbildung von Acrylamid und Glycidamid am N-terminalen Valin des Hämoglobins

Die Reaktivität von Acrylamid und Glycidamid mit dem N-terminalen Valin des Hämoglobins ist von grundlegender Bedeutung für die Interpretation der Gehalte von AAVal und GAVal. Nur unter dieser Voraussetzung können Überlegungen zu dem physiologisch vorhandenen Verhältnis von Acrylamid zu Glycidamid im Blut nach Acrylamid-Aufnahme über die Nahrung, d.h. der Umwandlungsrate von Acrylamid zu Glycidamid im Menschen, angestellt werden. Die bei der Dosimetrie beobachtete, ungefähr um den Faktor 2-4 höhere relative Bindungsrate des Acrylamids an das N-terminale Valin des Hämoglobins im Vergleich zu Glycidamid zeigte sich sowohl bei den Versuchen, in denen die Blutproben mit 30 μM bis 3 mM AA/GA bis zu 72 Stunden inkubiert wurden und die Adduktgehalte mit LC/MS/MS bestimmt wurden, als auch bei den Inkubationen mit 0,3 bis 10 μM AA bzw. GA und Quantifizierung mit

GC/MS. Das zum Ansetzen der Inkubationslösung verwendete Glycidamid, das unter Argon gelagert wurde, zeigte keine Anzeichen für eine hydrolytische Umwandlung zu Glyceramid im ^1H -NMR-Spektrum.

Es ist bekannt, dass die relative nukleophile Stärke eines Nukleophils in der folgenden Reihenfolge, angegeben als n -Werte, ansteigt: $\text{H}_2\text{O} = 0$ (per Definition); Sauerstoffatome der DNA-Basen ≈ 2 ; Guanin-N7 $\approx 3,5$; Protein- $\text{NH}_2 \approx 4$ -5; Protein-SH ≈ 5 -6 [Ross, 1962, Tornqvist *et al.*, 2002]. Bergmark *et al.* testeten die Reaktivität von Acrylamid und Glycidamid gegenüber Cysteingruppen im Blut von Ratten. Bei diesen *in vitro* Versuchen zeigte die Reaktion von Acrylamid mit Cystein ($k_{\text{cys}} = 1,8 \times 10^{-3} \text{ L/g Hb} \times \text{h}^{-1}$) eine ungefähr doppelt so hohe Adduktbildungskonstante 2. Ordnung als die entsprechende Reaktion mit Glycidamid ($k_{\text{cys}} = 0,9 \times 10^{-3} \text{ L/g Hb} \times \text{h}^{-1}$). Die bei diesen Versuchen ermittelten Eliminationskonstanten erster Ordnung betrugen $0,37 \text{ h}^{-1}$ für Acrylamid und $0,48 \text{ h}^{-1}$ für Glycidamid. Der Hämoglobinbindungsindex, bestimmt aus *in vivo* Versuchen an Ratten, denen entweder Acrylamid oder Glycidamid in Dosen von bis zu $100 \text{ mg/kg KG/d i.p.}$ injiziert wurden, zeigte für Acrylamid einen Wert von $6400 \text{ pmol (g Hb)}^{-1} / \mu\text{mol (kg KG)}^{-1}$ und für Glycidamid einen Wert von $1820 \text{ pmol (g Hb)}^{-1} / \mu\text{mol (kg KG)}^{-1}$ [Bergmark *et al.*, 1991]. Durch die i.p. Injektion wurde der bei der oralen Aufnahme gegebene Einfluss der Leber („first pass“-Effekt) auf die Adduktbildung im Blut vermieden. Die *in vitro* beobachtete höhere Reaktivität von Acrylamid (Faktor 2) zeigt sich unter *in vivo* Bedingungen noch deutlicher (Faktor 3,5). Da Acrylamid in einem größeren Umfang als Glycidamid mit den SH-Gruppen im Hämoglobin, die eine besonders hohe Nukleophilität aufweisen, reagiert, ist davon auszugehen, dass es sich bei Acrylamid um ein im Vergleich zu Glycidamid stärkeres Elektrophil handelt. Dieses Ergebnis spiegelt sich auch in den im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Dosimetrieversuchen, bei denen sich eine im Vergleich zu Glycidamid höhere Reaktivität des Acrylamids gegenüber des (relativ zu SH-Gruppen geringer) nukleophilen N-terminalen Valins zeigte, wider. Die sterische Hinderung der N-terminalen Aminogruppe des Hämoglobins könnte ebenfalls einen Einfluss auf die relative Reaktivität von Acrylamid und Glycidamid speziell an diesem nukleophilen Zentrum haben [Friedman, 2003]. Das geringer elektrophile Glycidamid reagiert zwar deutlich weniger schnell mit den relativ stark nukleophilen NH_2 - oder SH-Gruppen der Proteine, jedoch bevorzugt mit den schwächer nukleophilen Zentren der DNA wie der N7-Position des Guanins, dies sogar 100-1000 mal stärker als Acrylamid [Gamboa da Costa *et al.*, 2003, Segerback *et al.*, 1995, Zeynep Atay *et al.*, 2005]. In Übereinstimmung hierzu zeigte sich auch bei den Untersuchungen des

genotoxischen Potentials der beiden Substanzen mittels Comet Assay im Rahmen dieses Projektes eine deutliche Reaktivität von Glycidamid gegenüber den Basen der DNA (während Acrylamid inaktiv war) [Baum *et al.*, 2005]. Gemäß des HSAB-Konzeptes sind die Reaktionsraten und Selektivitäten von Elektrophilen und Nukleophilen abhängig von vergleichbaren Zuständen von „Härte“. Die bevorzugte Reaktivität ist vorrangig auf hochenergetische Übergangszustände zurückzuführen, die als Reaktionsbarrieren wirken, so z.B. zwischen einem harten Elektrophil und einem weichen Nukleophil [Coles, 1984, LoPachin und DeCaprio, 2005]. Bei *in vitro* Inkubationen von Rattenblutproben im Rahmen von Studien mit Nagern wurden wiederholt im Vergleich zu Acrylamid höhere relative Adduktgehalte von Glycidamid mit der N-terminalen NH₂-Gruppe gefunden. Die Werte zeigen jedoch auch keine eindeutige Tendenz, so fanden Fennell *et al.* nur 1,3-fach höhere Adduktgehalte von Glycidamid gegenüber dem N-terminalen Valin im Rattenhämoglobin als Acrylamid, während dieses Verhältnis von Tareke *et al.* als sogar 3,3-fach höher angegeben wurde.

Desweiteren wurden deutliche Speziesunterschiede festgestellt. Während Fennell *et al.* Reaktionsratenverhältnisse an der N-terminalen Aminogruppe (GA im Vergleich zu AA) von 1,3 für Ratte und 1,6 für den Menschen fanden, ergaben die Studien von Tareke *et al.* entsprechende Verhältniswerte von 4,8 für die Maus, 3,3 für die Ratte und sogar 8,0 für den Menschen [Fennell *et al.*, 2005, Tareke *et al.*, 2006]. Die Speziesunterschiede erklären sich z.T. durch eine abweichende Anzahl von Cystein-Gruppen im Hämoglobin der jeweiligen Spezies [Marquardt und Schäfer, 2004]. Es ist jedoch zu beachten, dass sowohl Fennell *et al.* als auch Tareke *et al.* die Inkubationsversuche mit hämolysiertem Blut durchführten. Da Erythrozyten eine ca. 500 mal höhere GSH-Konzentration als das Plasma besitzen [Jones *et al.*, 1998], werden durch die Hämolysse große Mengen von GSH mobilisiert, die nun ebenfalls einen Einfluss auf die Menge des Acrylamids bzw. Glycidamids haben, welche mit dem N-terminalen Valin reagieren kann. Diese *in vitro* erzeugte Situation hat jedoch wenig mit den physiologischen Verhältnissen gemeinsam. Es ist denkbar, dass eine größere GSH-Konzentration als Folge einer Hämolysse, eine GSH-Depletion bevorzugt durch Acrylamid zur Folge hat und deshalb die Glycidamidaddukt-Bildung größer erscheint, als dies bei den eigenen Inkubationsversuchen, bei denen intaktes Vollblut verwendet wurde, zu beobachten war. Dieser Überlegung sowie den Ergebnissen von Bergmark *et al.* [Bergmark *et al.*, 1991] stehen jedoch auch experimentelle Befunde gegenüber, die eine effektivere Depletion von GSH mit Glycidamid zeigen. So fanden Kurebayashi *et al.* eine im Vergleich zu Acrylamid 1,5-

fach effektivere GSH-Depletion [Kurebayashi und Ohno, 2006]. Im Gegensatz dazu zeigte sich in orientierenden Untersuchungen zu der Kinetik der Reaktion von Acrylamid und Glycidamid mit Glutathion in wässrigem Medium, dass die Bindung von Acrylamid an GSH im Vergleich zu Glycidamid wesentlich schneller und in einem größeren Umfang verläuft [Mönkemeyer, 2006].

Die Hintergrundgehalte von AAVal und GAVal weisen bei Nichtrauchern in der Regel ungefähr gleich hohe Werte bzw. tendenziell geringere GAVal-Gehalte auf. Dieser Sachverhalt könnte darauf hindeuten, dass bei geringeren Acrylamidkonzentrationen über einen längeren Zeitraum die Bindung an SH-Gruppen für die relativ verminderten AAVal-Gehalte verantwortlich sein könnte. Barber *et al.* zeigten für die Hämoglobincysteinadduktbildung in der Ratte, dass im Vergleich einer subchronischen Niedrigdosis-Exposition (oral, 2.8 mM in Trinkwasser) mit Acrylamid im Vergleich zu einer subakuten (i.p., 50 mg/kg) Exposition ca. 30% weniger Acrylamidaddukte und ca. zweifach mehr Glycidamidaddukte gefunden wurden [Barber *et al.*, 2001]. Hamdan *et al.* zeigten in Untersuchungen mittels MALDI-TOF-MS, dass nach den SH-Gruppen des Cysteins nicht die freie α -Aminogruppe sondern die ϵ -Aminogruppe des Lysins die nachgeordnet wichtigste Rolle bei der Adduktbildung von Acrylamid mit Proteinen spielt [Hamdan *et al.*, 2001]. Es ist deshalb denkbar, dass auch die Reaktion mit Lysin einen Einfluss auf die Adduktbildung von Acrylamid mit dem N-terminalen Valin bei geringen Acrylamid-Konzentrationen haben kann.

Insgesamt betrachtet ist ein Rückschluss auf die Umwandlungsrate von Acrylamid zu Glycidamid allein auf der Basis der Hämoglobinaddukte als schwierig anzusehen, da der Einfluss der Reaktivitäten anderer nukleophiler Zentren nicht nur vom Versuchsdesign (*in vivo* mit „first pass“-Effekt in verschiedenen Spezies, *in vitro* mit intaktem Vollblut oder lysiertem Blut) sondern auch von der Konzentration der Elektrophile beeinflusst wird. Zur Klärung der Umwandlungsrate von Acrylamid in Glycidamid im Organismus ist eine Tierstudie oder Humanverzehrstudie, die sowohl die Hämoglobinaddukte als auch die Mercaptursäuren von Acrylamid und Glycidamid erfasst, als besser geeignet zu betrachten.

6.5 Diskussion der *in vivo* Ergebnisse aus der humanen Verzehrstudie mit Acrylamid

Als Teil der humanen Verzehrstudie „Bedeutung der CYP 2E1-Aktivität für die Toxikokinetik von Acrylamid beim Menschen“ (Institut für Pharmakologie der

Universität zu Köln) wurden im Rahmen dieser Arbeit die Hämoglobinadduktgehalte von Acrylamid und Glycidamid von 3 der 16 teilnehmenden Probanden mittels GC/MS quantifiziert (s. Abbildung 39, Abbildung 41 und Abbildung 43). In der Referenzphase R, bei der die Probanden einmalig 1 mg Acrylamid in Form von Kartoffelchips erhielten, wies der Biomarker AAVal einen Anstieg um durchschnittlich 6 pmol/g Hb (17 %) auf, bei zwei der drei Probanden mit statistischer Signifikanz. In der Testperiode 1 erhielten die Probanden zusätzlich zu einmalig 1 mg Acrylamid in Form von Kartoffelchips den CYP 2E1-Inhibitor Disulfiram. In diesem Studienabschnitt zeigten die AAVal-Gehalte der Probanden mit durchschnittlich 15 pmol/g Hb (39 %) den höchsten Anstieg im Vergleich zu den beiden anderen Studienabschnitten in allen drei Probanden mit statistischer Signifikanz. In der Testperiode 2, in der die Probanden nach einwöchiger Vorbehandlung mit täglich 48 mL Ethanol in Form von Kölschbier den anderen Studienperioden entsprechend einmalig 1 mg Acrylamid in Form von Kartoffelchips erhielten, stiegen die AAVal-Gehalte um durchschnittlich 8 pmol/g Hb (19 %). Dieser Anstieg wies bei zwei der drei Probanden statistische Signifikanz auf. Die entsprechenden GAVal-Gehalte der drei Probanden zeigen für die einzelnen Studienperioden betrachtet keine statistisch signifikanten Zuwachsraten. Jedoch lässt sich für jeden Probanden die Entwicklung von GAVal über die gesamte Studiendauer beschreiben. So steigt GAVal bei Proband 04 um insgesamt 16 pmol/g Hb (46 %) und bei Proband 07 um insgesamt 19 pmol/g Hb (114 %) an, bei Proband 10 ist abweichend dazu mit -4 pmol/g Hb (-12 %) eine leichte Abnahme zu beobachten, die aber auch auf die schlechtere Detektierbarkeit von GAVal bei diesem Probanden zurückgeführt werden kann. Der Biomarker AAVal zeigt also durch die Gabe von Acrylamid einen Zuwachs, der in den einzelnen Studienabschnitten deutlich erkennbar ist, während der Biomarker GAVal nur auf die gesamte Studiendauer bezogen einen Zuwachs zeigt, der jedoch bis zu 114 % des Ausgangswertes betragen kann.

In einer vergleichbaren humanen Verzehrsstudie, bei der 6 Probanden eine Woche lang täglich 115 µg/Tag (1,9 µg/kg KG/Tag) in Form von ca. 85 g Kartoffelchips aufnahmen, zeigte sich ein Zuwachs von AAVal um durchschnittlich 7 pmol/g Hb (18 %) und ein Zuwachs von GAVal um 6 pmol/g Hb (26 %) [Vesper *et al.*, 2005]. Jedoch zeigen die Einzelwerte eine sehr große Variationsbreite, die bei AAVal von -6 bis +19 pmol/g Hb (-15 bis +54 %) und bei GAVal von -5 bis +18 pmol/g Hb (-17 bis 79 %) reicht. Das in der Studie von Vesper *et al.* bestimmte GAVal/AAVal-Verhältnis betrug sowohl zu Beginn der Studie als auch nach einwöchiger Acrylamidexposition durchschnittlich 0,7 [Vesper *et al.*, 2005]. Ein wesentlicher Unterschied zu der in

dieser Arbeit dargestellten Studie ist, dass die ungefähr vergleichbare Menge Acrylamid nicht einmalig sondern auf 7 Tage verteilt gegeben wird. Bezogen auf den gesamten Studienverlauf der in dieser Arbeit dargestellten Studie wurde eine immerhin 3-fach erfolgte Gabe von Acrylamid durchgeführt, die AAVal um durchschnittlich 82 % und GAVal um durchschnittlich 49 % ansteigen lässt, während unter den Bedingungen der Studie von Vesper et al. mit einer geringeren Gesamtdosis an Acrylamid die Anstiegsraten für AAVal 18% und für GAVal 26 % betragen. Ob sich bei diesem Vergleich die Sättigung der oxidativen Metabolisierung von Acrylamid zu Glycidamid bei höheren Konzentrationen von Acrylamid widerspiegelt, ist auf Grund der hohen Variabilität der Probenwerte und der geringen Anzahl der Probanden jedoch nicht eindeutig feststellbar.

In der Humanstudie von Fennell et al. nahmen je 5 Probanden 0,5; 1,0 oder 3,0 mg/kg KG $^{13}\text{C}_3$ -Acrylamid in Flüssigkeit oral auf, während eine weitere Probandengruppe, bestehend aus 5 Probanden, dermal drei tägliche Dosen von 3,0 mg/kg KG (als 50%ige Lösung) verabreicht bekamen. Die nach oraler Aufnahme erhaltenen Mengen an $^{13}\text{C}_3$ -AAVal von 514, 914 und 2480 pmol/g Hb und an $^{13}\text{C}_3$ -GAVal von 186, 344 und 1076 pmol/g Hb nach 24 Stunden stehen einer bei dermalen Gabe gefundenen Anstiegsrate von 464 pmol/g Hb für $^{13}\text{C}_3$ -AAVal und 316 pmol/g Hb für $^{13}\text{C}_3$ -GAVal nach 5 Tagen und einer tatsächlich dermal aufgenommenen Dosis von 2,35 mg/kg KG gegenüber [Fennell et al., 2005]. Durch die relativ hohen Dosen ist der deutliche Anstieg der beiden Biomarker deutlich größer als bei den anderen beiden diskutierten Verzehrsstudien. Die Gehalte des gebildeten $^{13}\text{C}_3$ -GAVal sind deutlich geringer als die von $^{13}\text{C}_3$ -AAVal, jedoch zeigt sich ein mit der Dosis zunehmendes $^{13}\text{C}_3$ -GAVal/ $^{13}\text{C}_3$ -AAVal-Verhältnis, das den bisherigen Erkenntnissen einer Sättigung der GA-Bildung bei hohen Acrylamid-Konzentrationen widerspricht. Bei den drei Probanden der in dieser Arbeit vorgestellten Humanverzehrsstudie zeigt sich bei Gabe von Acrylamid in der Testperiode 1, in der durch Disulfiram das Cytochrom P450 2E1-Enzym gehemmt wird, ein größerer Zuwachs als dies bei den beiden anderen Studienperioden zu beobachten ist. Diese Tendenz lässt sich teilweise auch bei den restlichen 13 Probanden erkennen, von denen 6 einen ebenfalls relativ zu den anderen Studienperioden höheren Anstieg des AAVal-Gehaltes aufweisen (Daten nicht gezeigt).

Da sich die Berechnung der statistischen Signifikanz des Anstiegs von AAVal bei den drei in dieser Arbeit gezeigten Probanden zunächst nur auf den jeweiligen Anfangs- und Endpunkt der Studienperioden bezog, wurden weitere statistische Auswertungen unter Einbeziehung aller Zwischenmesspunkte durchgeführt. Es sollte geprüft

werden, ob über die gesamte Bildungskurve von AAVal ein statistisch signifikanter Anstieg gegeben ist. Für die Auswertung des Kurvenverlaufs wurde das sog. Gompertz-Modell gewählt, da es den als sigmoid angenommenen Verlauf der Adduktbildung von Acrylamid mit dem N-terminalen Valin gut beschreibt. Ein derartiger Kurvenverlauf der Hämoglobinadduktbildung wurde auch von Törnqvist et al. und Tareke et al. gezeigt [Tareke *et al.*, 2006, Törnqvist *et al.*, 2002]. Die Konstruktion der Konfidenzintervalle mit Hilfe dieses Modells stellt kein statistisches Standardverfahren dar, sondern wurde speziell für diese Fragestellung angepasst. Die aus den Messwerten berechneten 95 %- und 99 %-Konfidenzintervalle sollten im Idealfall disjunkt sein, d.h. sich für die Zeitpunkte 0 und 24 h nicht überlappen. Die 95 %-Konfidenzintervalle sind in Abbildung 46 dargestellt. Diese Bedingung ist bei dem 99 %-Konfidenzintervall nur für die Studienperiode T1 der Probanden 04 und 07 erfüllt, womit die ausgeprägte statistische Signifikanz des AAVal-Anstiegs in dieser Studienperiode unter Einbeziehung aller Messwerte bestätigt wird. Proband 10 konnte nicht in die Auswertung einbezogen werden, da der Datensatz die Voraussetzungen für die Anwendung des Modells nicht erfüllte. Es sei darauf hingewiesen, dass sich dennoch auch für Proband 10 in der Studienperiode T1 unter ausschließlicher Berücksichtigung des Anfangs- und Endzeitpunktes eine statistische Signifikanz des AAVal-Anstiegs mittels Student-t-Test zeigen ließ.

Da der tendenziell deutlicher ausgeprägte Anstieg von AAVal in der Studienperiode T1 auftrat, in der auch eine Gabe von Disulfiram erfolgte, ist ein Einfluss dieser Substanz auf den beobachteten Effekt zu vermuten. Disulfiram ist ein selektiver Inhibitor für CYP 2E1, der sowohl nach einmalig akuter als auch nach chronischer Gabe eine vergleichbare Verminderung der CYP 2E1 Aktivität bewirkt [Emery *et al.*, 1999, Frye und Branch, 2002, Kharasch *et al.*, 1993]. Durch Hemmung der oxidativen Umwandlung des Acrylamids zu Glycidamid könnte in der Folge im Vergleich zu den beiden anderen Studienperioden in der Studienperiode T1 eine höhere Acrylamidkonzentration zu einer höheren Bildung von AAVal geführt haben. Eine ähnliche Beobachtung wurde von Ghanayem et al. gemacht, der die Rolle von CYP 2E1 bei der Umwandlung von Acrylamid in Glycidamid in Mäusen untersuchte. Dabei zeigte sich, dass in CYP 2E1-Null-Mäusen, die mit derselben Dosis Acrylamid behandelt wurden, die Gehalte von AAVal doppelt so hoch waren als jene in den Wildtyp-Mäusen, die über die Möglichkeit des oxidativen Metabolismus zu Glycidamid verfügten [Ghanayem *et al.*, 2005]. Aufgrund der höheren Umwandlungsrate von Acrylamid zu Glycidamid in der Maus im Vergleich zum Menschen ist der von Ghanayem beobachtete Effekt sehr deutlich ausgeprägt. Da für

die Expression von CYP 2E1 individuelle Unterschiede existieren, die durch diverse Chemikalien, hormonelle Einflüsse und metabolische Veränderungen (z. B. Fettleibigkeit) sowie einen genetischen Polymorphismus im CYP 2E1-Gen beeinflusst sind, ist zu erwarten, dass eine Hemmung von CYP 2E1 individuell unterschiedlich stark ausgeprägte Effekte hervorrufen könnte [Bolt *et al.*, 2003, McCarver *et al.*, 1998]. Bei einem Probanden mit einer höheren CYP 2E1-Expression wäre im Fall einer Hemmung des oxidativen Stoffwechsels ein deutlicherer Anstieg von AAV_{al} relativ zu den Probanden mit generell niedriger Expression von CYP 2E1 zu vermuten. Eine Exposition gegenüber Ethanol sollte hingegen eine Induktion von hepatischem und extrahepatischem CYP 2E1 bewirken (verstärkte Enzymsynthese und Enzymstabilisierung) [McCarver *et al.*, 1998, Roberts *et al.*, 1995, Tsutsumi *et al.*, 1993]. Auch bei moderatem Alkoholkonsum wurde eine deutliche Induktion von CYP 2E1 gezeigt [Oneta *et al.*, 2002]. Raucy *et al.* zeigten, dass Alkoholiker im Vergleich zu Nicht-Alkoholikern sowohl 2,3-fach höhere Level von CYP 2E1 in Lymphozyten als auch eine 2,1-fach höhere Clearance von Chlorzoxazon aufwiesen [Raucy *et al.*, 1997]. Chlorzoxazon, dessen 6-Hydroxylierung überwiegend durch CYP 2E1 katalysiert wird, ist ein geeignetes Substrat zur Bestimmung der Expression von CYP 2E1. Diese Phänotypisierung beruht auf dem metabolischen Quotienten 6-Hydroxychlorzoxazon/Chlorzoxazon im Plasma (oder Urin) nach einmaliger oraler Gabe von Chlorzoxazon. Im Rahmen der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Studie wurde eine solche Phänotypisierung in Plasma der Probanden in der Studienperiode P, 2 Stunden nach Gabe von Chlorzoxazon, im Plasma durchgeführt [Fuhr und Tomalik-Scharte, 2006]. Die Probanden 04, 07 und 10 weisen 6-Hydroxychlorzoxazon/Chlorzoxazon-Quotienten von 0,34, 0,76 und 0,13 auf. Während die Probanden 04 und 10 keinen genetischen Polymorphismus im CYP 2E1-Gen aufweisen, ist Proband 07 heterozygot für *CYP 2E1*6* [Tomalik-Scharte, persönliche Mitteilung]. In Europa sind 10 % der Bevölkerung Träger dieses Polymorphismus, während weitere 5 % heterozygot für *CYP 2E1*5A* sind [Bolt *et al.*, 2003]. Bei den beiden Probanden 04 und 07, die höhere 6-Hydroxychlorzoxazon/Chlorzoxazon-Quotienten als Proband 10 zeigen und damit offenbar über eine höhere CYP 2E1-Aktivität verfügen, war in der Studienperiode T1 der Anstieg von AAV_{al} bei Hemmung von CYP 2E1 ausgeprägter. Für diese beiden Probanden wurde auch in der statistischen Auswertung ein signifikanter Anstieg von AAV_{al} gezeigt. Allerdings weist Proband 04 in der T1-Phase einen größeren Anstieg von AAV_{al} als Proband 07 auf, obwohl bei Proband 04 ein geringerer 6-Hydroxychlorzoxazon/Chlorzoxazon-Quotient bestimmt wurde. Daher ist in diesem Fall von einer eher tendenziellen Übereinstimmung zwischen dem individuellen

Anstieg von AAVal in der Studienperiode T1 und dem Phänotypen des jeweiligen Probanden auszugehen.

In Hinblick auf die Studienperiode T2, bei der der Gabe von Acrylamid in Form von Kartoffelchips eine einwöchige Induktion von CYP 2E1 durch Ethanolaufnahme vorausging, kann eine verstärkte Metabolisierung von Acrylamid zu Glycidamid vermutet werden. Dies könnte dann in einer verminderten Bildung von AAVal und einer verstärkten Bildung von GAVal resultieren. Eine verminderte Bildung von AAVal kann in der Studienperiode T2 nicht beobachtet werden, da der Anstieg von AAVal sogar größer erscheint als in der Referenzphase R, bei der ausschließlich Acrylamid aufgenommen wurde. Eine verstärkte Bildung von GAVal in der Studienperiode T2 kann bei den 3 Probanden ebenfalls nicht festgestellt werden.

Die Rolle des oxidativen Metabolismus im Menschen im Vergleich zu dem Phase-II-Metabolismus ist in der Diskussion. Studien, in denen die Bildung von AAMA und GAMA im Menschen nach oraler Gabe von Acrylamid untersucht wurden, deuten darauf hin, dass der oxidative Metabolismus gegenüber dem Phase-II-Metabolismus eine untergeordnete Rolle spielen könnte. So fanden Fuhr et al. ein GAMA/AAMA-Verhältnis von $0,12 \pm 0,02$ [Fuhr et al., 2006]. In der in dieser Arbeit beschriebenen Humanverzehrstudie sank das molare GAMA/AAMA-Verhältnis in der CYP 2E1-Inhibitionsphase (T1) signifikant auf 0,008 ab, während es in der Referenz (R)- und der Induktionsphase (T2) 0,024 betrug [Doroshenko et al., 2008]. Bei Betrachtung des Anstiegs von GAVal über die gesamte Dauer der Studie lässt sich jedoch eine weitere interessante Tendenz beobachten. Der Anstieg an GAVal betrug für die Probanden 04, 07 und 10 insgesamt 16 pmol/g Hb (46 %), 19 pmol/g Hb (114 %) und -4 pmol/g Hb (-12 %). Der beim Probanden 07 am höchsten ausgeprägte Zuwachs an GAVal korreliert mit dem höchsten 6-Hydroxychlorzoxazon/Chlorzoxazon-Quotienten von 0,76, während Proband 04 mit dem zweithöchsten GAVal-Anstieg auch den zweithöchsten Quotienten von 0,34 aufweist. Proband 10, der auf Basis der geringsten CYP 2E1-Aktivität (6-Hydroxychlorzoxazon/Chlorzoxazon-Quotient von 0,13) den am geringsten ausgeprägten oxidativen Metabolismus von Acrylamid zu Glycidamid aufweisen müsste, zeigt tatsächlich sogar einen nicht signifikanten Trend zu einem reduzierten GAVal-Gehalt, der jedoch im Bereich der Messungenauigkeit liegt. Es zeigt sich also ungeachtet der Tatsache, dass während der Studie sowohl eine Hemmung als auch eine Induktion von CYP 2E1 stattgefunden hat, über den gesamten Zeitraum der Studie eine tendenzielle Übereinstimmung zwischen dem individuellen CYP 2E1-Phänotypen und dem tendenziellen Verhalten des Biomarkers GAVal. Diese

Tendenz bestätigt sich jedoch nicht für die Gesamtheit der 16 Probanden und lässt den Schluss zu, dass die individuelle CYP 2E1-Aktivität, die Induktion von CYP 2E1 und Polymorphismen keinen eindeutigen Effekt auf die Toxikokinetik von Acrylamid haben [Doroshenko *et al.*, 2008].

In Anbetracht der mittleren Lebensdauer der Erythrozyten von 126 Tagen ist nach einer einmaligen Gabe von Acrylamid und einer anschließenden Acrylamid-armen Ernährung davon auszugehen, dass jeden Tag 1/126 des Hämoglobinadduktgehaltes verloren geht [Törnqvist *et al.*, 2002]. Die Abnahme von im Wesentlichen AAVa lässt sich für die einzelnen Probanden ausgehend von dem 24 h-Messwert an dem 2 Wochen später gemessenen Initialwert der darauffolgenden Studienphase teilweise erkennen. Mit der Entnahme von weiteren Blutproben in diesen Wash-out-Phasen wäre das Absinken der Hämoglobinadduktgehalte vermutlich noch besser nachvollziehbar gewesen.

Bergmark *et al.* beobachteten die Bildung von Artefakten bei der Lagerung von gefrorenen Hämolysaten in ca. 20 % der Proben (bei -80 °C), die zu einer Erhöhung des gemessenen Levels von Hydroxyethylvalin (Biomonitoring von Ethylenoxid) jedoch nicht bei der Lagerung von aufgereinigtem Hämoglobin (bei -20 °C) [Törnqvist, 1990]. Eine derartige Artefaktbildung wurde in der vorliegenden Studie nicht beobachtet.

6.6 Diskussion der Ergebnisse aus den Verteilungsversuchen mit ¹⁴C-Acrylamid

Um die Effektivität der Bindung von Acrylamid an Hämoglobin unter Berücksichtigung der übrigen im Humanblut vorhandenen nukleophilen Zentren zu untersuchen, wurde humanes Vollblut mit 3 bzw. 30 µM [2,3-¹⁴C]-Acrylamid bis zu 6 Stunden inkubiert und anschließend die Menge der Radioaktivität in den einzelnen Blutkompartimenten gemessen. Bei diesen Verteilungsversuchen zeigte sich, dass sich Acrylamid schnell auf die Blutkompartimente verteilt, da bereits nach 15 Minuten mehr als 30 % der Radioaktivität in den Erythrozyten gefunden werden kann. Nach ca. 1 Stunde ist ein statistisch signifikanter Anstieg an Radioaktivität in den Erythrozyten feststellbar ($p < 0,01$). Nach 6 Stunden Inkubationszeit werden maximal 52 % der Radioaktivität in den Erythrozyten lokalisiert. Ein Anstieg ist bei den Inkubationsversuchen mit 30 µM nur bis zu 4 Stunden, jedoch nicht nach 6 Stunden zu beobachten. Es kann davon ausgegangen werden, dass eine während dieser Behandlungszeit auftretende Lyse der Erythrozyten und als Folge davon eine weniger gut funktionierende

Probenauftrennung zu einem Verlust der Radioaktivität in der Erythrozyten-Fraktion führt. Der an das Plasmaprotein gebundene Anteil beträgt 9-14 % und zeigt nur einen geringfügigen Anstieg in Abhängigkeit von der Inkubationszeit.

Bei einer näheren Untersuchung der Erythrozyten nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden liegen 7 % der Gesamtradioaktivität an das Hämoglobin und 8 % an Erythrozyten-Fragmente gebunden vor, während ca. 18 % auf das Erythrozyten-Zytosol entfallen. Über den zeitlichen Verlauf der Verteilung innerhalb der Erythrozyten kann keine Aussage gemacht werden. Insgesamt zeigte sich, dass unter den gewählten Bedingungen 25-35 % der Radioaktivität an Proteine bzw. Zellfragmente gebunden vorliegen. Damit zeigte das Plasmaprotein eine effektivere Bindung des Acrylamids als das Hämoglobin, jedoch ist davon auszugehen, dass auch die Erythrozyten-Fragmente sehr wahrscheinlich Reste von Hämoglobin enthalten und somit die Bindung an das Hämoglobin insgesamt etwas höher als 7 % liegen dürfte. Ein Milliliter Blut enthält ca. 150 mg Hämoglobin, 30 mg Serumalbumin und 0,005-0,008 mg DNA [Törnqvist *et al.*, 2002]. Aufgrund dieser Quantitäten ist eine effektivere Bindung des Acrylamids an Plasmaproteine zunächst erstaunlich. Es ist jedoch bekannt, dass eine Bindung an die Serumproteine quantitativ stärker ausgeprägt sein kann als an Hämoglobin [Marquardt und Schäfer, 2004, Watson und Mutti, 2004]. Dixit *et al.* zeigten *in vitro* eine ausgeprägte Affinität von Acrylamid zu Serumalbumin aus Rindern. Im Gleichgewichtszustand waren 25 % des Acrylamid an das Serumalbumin gebunden [Dixit *et al.*, 1986]. Tong *et al.* untersuchten die Reaktivität von Acrylamid mit GSH und Serumalbumin *in vitro*. Die Reaktionsraten von 0,0054 und 0,021 M⁻¹s⁻¹ für die Reaktionen von Acrylamid mit Serumalbumin bzw. GSH zeigen eine dreimal höhere Reaktivität gegenüber GSH. Die Ergebnisse unterstreichen, dass das Serumalbumin die wichtigste Thiol-Quelle darstellt mit dem Acrylamid vor dem Eintritt in Zellen reagiert, während innerhalb einer Zelle GSH der wesentliche thiolische Reaktionspartner für Acrylamid darstellt [Tong *et al.*, 2004].

Die Affinität von Acrylamid zu verschiedenen nukleophilen Zentren zeigt zumindest *in vivo* auch konzentrationsbedingte Unterschiede. So fanden Xie *et al.* in Mäusen bei Dosen >7,5 µg/kg KG Adduktlevel in der aufsteigenden Quantität von Protamin > Hämoglobin > Serumalbumin > DNA, während sich die Reihenfolge bei geringeren Dosen zu Serumalbumin > Protamin > Hämoglobin > DNA änderte [Xie *et al.*, 2006]. In Bezug auf die Ergebnisse der Verteilungsversuche ist folglich davon auszugehen, dass ein wesentlicher Anteil des radioaktiven Acrylamids im Erythrozyten-Zytosol (ca. 18 % der Gesamtradioaktivität) an GSH gebunden vorliegt. In einem geringeren Maße ist dies auch für die Radioaktivität im proteinfreien Plasma zu vermuten.

Aufgrund der hohen Wasserlöslichkeit des Acrylamids verteilt sich dieses zunächst statistisch über die verschiedenen Blutkompartimente. Innerhalb der Erythrozyten erfolgt dann eine vermutlich rasche Bindung an GSH sowie das Hämoglobin. Die relativ geringe Erhöhung der Radioaktivität in den Erythrozyten in Abhängigkeit von der Inkubationszeit weist vermutlich darauf hin, dass die Verteilung des Acrylamids zunächst rasch und gleichmäßig erfolgt und nach Reaktion mit den Thiolgruppen von GSH und Hämoglobin auf Grund eines entstehenden Konzentrationsgefälles zwischen Plasma und Erythrozyten-Zytosol weiteres Acrylamid in die Erythrozyten gelangt. Ähnliche Beobachtungen machten Galvani *et al.*, die mittels MALDI-TOF-MS die Alkylierung von Proteinen (α -Lactalbumin) untersuchten. Mit dem Alkylans Iodacetamid wurde innerhalb von 2 Minuten ein Alkylierungsgrad von ~70 % erreicht, während die restlichen 30 % des Proteins erst innerhalb der folgenden 6 Stunden alkyliert wurden. Diese Reaktionskinetik wird auf die unterschiedlichen Affinitäten des Alkylans zu den SH-Gruppen als favorisiertes Target sowie zu der ϵ -Aminogruppe in der Lysinseitenkette und der α -Aminogruppe als nachgeordnete Targets zurückgeführt [Galvani *et al.*, 2001].

Eine Limitierung der angewendeten Methodik ist die Durchführung im Halbmikromaßstab, die zu einer größeren Variationsbreite der Messwerte führt. Es wurde jedoch die schnelle Verteilung des Acrylamids in den Blutkompartimenten, sowie die Bindung des Acrylamids an die Blutproteine nach vierstündiger Inkubationszeit mit einer ausreichenden Genauigkeit untersucht. Die Abschätzung des prozentualen Anteils der Bindung des Acrylamids an GSH erfordert indes weitere Untersuchungen.

7 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Adduktbildung von Acrylamid und Glycidamid mit dem N-terminalen Valin des Hämoglobins unter verschiedenen Aspekten untersucht.

Die Bestimmung der Biomarker AAVal und GAVal erfolgte unter Anwendung des modifizierten Edman-Abbaus und einer sich anschließenden Analytik mittels LC/MS/MS oder GC/MS. Die zur Quantifizierung von AAVal und GAVal benötigten Pentafluorphenylthiohydantoin-Derivate wurden synthetisiert und charakterisiert.

Mit Hilfe der GC/MS-Methodik wurden Hintergrundadduktgehalte gefunden, die bei Nichtrauchern durchschnittlich 37 pmol AAVal/g Hb und 21 pmol GAVal/g Hb betrugen, während Raucher mit durchschnittlich 91 pmol AAVal/g Hb deutlich höhere Werte aufwiesen. Diese Werte liegen im Bereich der üblicherweise gefundenen Hintergrundadduktgehalte für AAVal und GAVal. Ein Raucher wies abweichend davon mit 859 pmol AAVal/g Hb und 211 pmol GAVal/g Hb eine überdurchschnittlich hohe Hintergrundbelastung auf.

Es wurde eine Dosimetrie der Adduktbildung von Acrylamid und Glycidamid durch Inkubation von Humanblut durchgeführt. Die LC/MS/MS-Methodik wies dabei keine ausreichende Sensitivität auf. Die Kinetik dieser Reaktion im Konzentrationsbereich der Hintergrundadduktgehalte nach Inkubation mit 0,3, 3 und 10 μM für 1 bzw. 4 Stunden wurde deshalb mittels GC/MS untersucht. Nach vierstündiger Inkubation zeigte der AAVal-Gehalt bei Inkubation mit 0,3 μM Acrylamid einen statistisch signifikanten Anstieg ($p < 0,01$), während der GAVal-Gehalt erst bei Inkubation mit 3 μM Glycidamid statistisch signifikant anwuchs ($p < 0,01$). Im Hinblick auf die unter vergleichbaren Bedingungen mittels Comet Assay detektierten DNA-Strangbrüche ab 10 μM Glycidamid, kann auf Grund des geringen Konzentrationsabstandes ein partieller Schutz der Zellen vor Glycidamid-induzierten DNA-Schäden durch Adduktbildung mit dem Hämoglobin angenommen werden. Die um den Faktor 2-4 höher erscheinende Reaktivität von Acrylamid gegenüber dem N-terminalen Valin kann durch weitere Bestandteile im Blut mit nukleophilen Zentren beeinflusst sein.

Um die Effektivität der Abspaltung von AAVal und GAVal bei der Derivatisierung zu den PFPTH-Derivaten bei Quantifizierung des Adduktgehaltes berücksichtigen zu sollten Methoden zur Verwendung von Dipeptid-Standardsubstanzen etabliert werden. Auf Grund der Unsicherheiten bei der Charakterisierung wurden diese jedoch nur für orientierende Untersuchungen verwendet.

Nach Inkubation des humanen Vollblutes mit 3 und 30 μM [2,3- ^{14}C -Acrylamid] für 15 Minuten, 1, 4 oder 6 Stunden zeigte sich eine schnelle Verteilung des Acrylamids über die einzelnen Blutkompartimente und eine schnell erfolgende Reaktion mit nukleophilen Zentren. Die Radioaktivität liegt zu 9-14 % an Plasmaproteine gebunden vor, während auf das Hämoglobin 7 % und auf Erythrozytenfragmente weitere 8 % entfallen. Somit liegen 25-35 % des Acrylamids gebunden vor. Es ist jedoch auf Grund der hohen Konzentration von GSH im Erythrozyten-Zytosol eine insgesamt höhere Bindung des Acrylamids zu erwarten.

Im Rahmen einer humanen Acrylamid-Verzehrsstudie wurde die zeitliche Veränderung von AAVal und GAVal bei 3 ausgewählten Probanden nach der in der jeweiligen Studienphase in Form von Kartoffelchips verabreichten Menge von 1 mg untersucht. In der Referenzperiode R zeigte AAVal bei diesen Probanden einen durchschnittlichen Anstieg von 17 %. Eine höhere Zuwachsrate von 39 % zeigte AAVal in der Testperiode T1, in der CYP 2E1 durch Disulfiram gehemmt wurde und somit kein oxidativer Metabolismus zu Glycidamid stattfand. In der Testperiode T2, in der CYP 2E1 durch eine Vorbehandlung mit Ethanol induziert wurde, wies AAVal einen der Referenzphase vergleichbaren Anstieg um 19 % auf. Die höhere statistische Signifikanz des Anstiegs von AAVal in der Testperiode T1 im Vergleich zu den beiden anderen Studienabschnitten konnte mit Hilfe einer geeigneten statistischen Auswertung gezeigt werden. Für GAVal hingegen konnte auf Grund der größeren Messwertschwankungen nur für die gesamte Studiendauer ein Anstieg um 49 % festgestellt werden. Für den Anstieg von GAVal deutet sich ein Zusammenhang mit der individuellen CYP 2E1-Aktivität der drei Probanden, deren Phänotypisierung mittels Chlorzoxazon-Metabolismus bestimmt wurde. Diese Tendenz bestätigt sich jedoch nicht für die Gesamtheit der 16 Probanden.

In dieser Arbeit wurde die Effizienz der Adduktbildung von Acrylamid und Glycidamid mit Hämoglobin unter verschiedenen Aspekten aufgezeigt. Ob die protektiven Mechanismen auf zellulärer Ebene ausreichend sind, um elektrophile Xenobiotika wie Acrylamid und Glycidamid bis hin zu einem möglicherweise vorhandenen Schwellenwert biologisch zu inaktivieren, müssen weitere Untersuchungen aufzeigen.

8 Literatur

- Ahn, J. S., Castle, L., Tests for the depolymerization of polyacrylamides as a potential source of acrylamide in heated foods, *J Agric Food Chem* **2003**, *51*, 6715-6718.
- Aitio, A., Biomarkers and their use in occupational medicine, *Scand J Work Environ Health* **1999**, *25*, 521-528.
- Aitio, A., Kallio, A., Exposure and effect monitoring: a critical appraisal of their practical application, *Toxicol Lett* **1999**, *108*, 137-147.
- Albertini, R. J., Sram, R. J., Vacek, P. M., Lynch, J., Wright, M., Nicklas, J. A., Boogaard, P. J., Henderson, R. F., Swenberg, J. A., Tate, A. D., Ward, J. B., Jr., Biomarkers for assessing occupational exposures to 1,3-butadiene, *Chem Biol Interact* **2001**, *135-136*, 429-453.
- Amrein, T. M., Schonbachler, B., Escher, F., Amado, R., Acrylamide in gingerbread: critical factors for formation and possible ways for reduction, *J Agric Food Chem* **2004**, *52*, 4282-4288.
- Au, W. W., Oh, H. Y., Grady, J., Salama, S. A., Heo, M. Y., Usefulness of genetic susceptibility and biomarkers for evaluation of environmental health risk, *Environ Mol Mutagen* **2001**, *37*, 215-225.
- Au, W. W., Salama, S. A., Use of biomarkers to elucidate genetic susceptibility to cancer, *Environ Mol Mutagen* **2005**, *45*, 222-228.
- Aureli, F., Di Pasquale, M., Lucchetti, D., Aureli, P., Coni, E., An absorption study of dietary administered acrylamide in swine, *Food Chem Toxicol* **2007**, *45*, 1202-1209.
- Bader, M. H., H.; Wrbitzky, R., Querschnittsstudie zur ernährungs- und tabakrauchbedingten Belastung mit Acrylamid, *Deutsches Ärzteblatt* **2005**, *102*, A 2640-2643.
- Bagdonaite, K., Viklund, G., Skog, K., Murkovic, M., Analysis of 3-aminopropionamide: A potential precursor of acrylamide, *J Biochem Biophys Methods* **2006**, *69*, 215-221.
- Bahner, U., Schettgen, T., Angerer, J., Stopper, H., Klassen, A., Heidland, A., Acrylamide--no evidence for accumulation in end-stage renal disease patients using its hemoglobin adduct as biomarker, *Int J Artif Organs* **2004**, *27*, 728-730.
- Barber, D. S., Hunt, J. R., Ehrich, M. F., Lehning, E. J., LoPachin, R. M., Metabolism, toxicokinetics and hemoglobin adduct formation in rats following subacute and subchronic acrylamide dosing, *Neurotoxicology* **2001**, *22*, 341-353.
- Barlow, S., Renwick, A. G., Kleiner, J., Bridges, J. W., Busk, L., Dybing, E., Edler, L., Eisenbrand, G., Fink-Gremmels, J., Knaap, A., Kroes, R., Liem, D., Muller, D. J., Page, S., Rolland, V., Schlatter, J., Tritscher, A., Tueting, W., Wurtzen, G., Risk assessment of substances that are both genotoxic and carcinogenic report of an International Conference organized by EFSA and WHO with support of ILSI Europe, *Food Chem Toxicol* **2006**, *44*, 1636-1650.
- Baum, M., Fauth, E., Fritzen, S., Herrmann, A., Mertes, P., Rudolphi, M., Spormann, T., Zankl, H., Eisenbrand, G., Bertow, D., Acrylamide and glycidamide: approach towards risk assessment based on biomarker guided dosimetry of genotoxic/mutagenic effects in human blood, *Adv Exp Med Biol* **2005**, *561*, 77-88.
- Becalski, A., Lau, B. P., Lewis, D., Seaman, S. W., Acrylamide in foods: occurrence, sources, and modeling, *J Agric Food Chem* **2003**, *51*, 802-808.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L., Biochemie, 5. ed., **2003**.
- Bergmark, E., Hemoglobin adducts of acrylamide and acrylonitrile in laboratory workers, smokers and nonsmokers, *Chem Res Toxicol* **1997**, *10*, 78-84.
- Bergmark, E., Callemann, C. J., Costa, L. G., Formation of hemoglobin adducts of acrylamide and its epoxide metabolite glycidamide in the rat, *Toxicol Appl Pharmacol* **1991**, *111*, 352-363.
- Bergmark, E., Callemann, C. J., He, F., Costa, L. G., Determination of hemoglobin adducts in humans occupationally exposed to acrylamide, *Toxicol Appl Pharmacol* **1993**, *120*, 45-54.

- Besaratinia, A., Pfeifer, G. P., DNA adduction and mutagenic properties of acrylamide, *Mutat Res* **2005**, 580, 31-40.
- Bethge, Walter, Wiedemann, Kernphysik - Eine Einführung, Springer, **2001**.
- BfR, Abschätzung der Acrylamid-Aufnahme durch hochbelastete Nahrungsmittel in Deutschland, *BfR-Hefte* **2003a**.
- BfR, Quellen für Acrylamid in Kosmetika, **2003b**.
- Boettcher, M. I., Angerer, J., Determination of the major mercapturic acids of acrylamide and glycidamide in human urine by LC-ESI-MS/MS, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2005**, 824, 283-294.
- Boettcher, M. I., Schettgen, T., Kutting, B., Pischetsrieder, M., Angerer, J., Mercapturic acids of acrylamide and glycidamide as biomarkers of the internal exposure to acrylamide in the general population, *Mutat Res* **2005**, 580, 167-176.
- Bolt, H. M., Roos, P. H., Thier, R., The cytochrome P-450 isoenzyme CYP2E1 in the biological processing of industrial chemicals: consequences for occupational and environmental medicine, *Int Arch Occup Environ Health* **2003**, 76, 174-185.
- Boon, P. E., de Mul, A., van der Voet, H., van Donkersgoed, G., Brette, M., van Klaveren, J. D., Calculations of dietary exposure to acrylamide, *Mutat Res* **2005**, 580, 143-155.
- Börner, **2002**.
- Calleman, C. J., Bergmark, E., Costa, L. G., Acrylamide is metabolized to glycidamide in the rat: evidence from hemoglobin adduct formation, *Chem Res Toxicol* **1990**, 3, 406-412.
- Calleman, C. J., Bergmark, E., Stern, L. G., Costa, L. G., A nonlinear dosimetric model for hemoglobin adduct formation by the neurotoxic agent acrylamide and its genotoxic metabolite glycidamide, *Environ Health Perspect* **1993**, 99, 221-223.
- Calleman, C. J., Ehrenberg, L., Jansson, B., Osterman-Golkar, S., Segerback, D., Svensson, K., Wachtmeister, C. A., Monitoring and risk assessment by means of alkyl groups in hemoglobin in persons occupationally exposed to ethylene oxide, *J Environ Pathol Toxicol* **1978**, 2, 427-442.
- Calleman, C. J., Wu, Y., He, F., Tian, G., Bergmark, E., Zhang, S., Deng, H., Wang, Y., Crofton, K. M., Fennell, T., et al., Relationships between biomarkers of exposure and neurological effects in a group of workers exposed to acrylamide, *Toxicol Appl Pharmacol* **1994**, 126, 361-371.
- Cammann, Instrumentelle Analytische Chemie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2001**.
- Carere, A., Genotoxicity and carcinogenicity of acrylamide: a critical review, *Ann Ist Super Sanita* **2006**, 42, 144-155.
- Coles, B., Effects of modifying structure on electrophilic reactions with biological nucleophiles, *Drug Metab Rev* **1984**, 15, 1307-1334.
- Collins, J., Swaen, G., Marsh, G., Utidjian, M., Carporossi, J., Lucas, L., Mortality patterns among workers exposed to acrylamide, *Journal Occup Med* **1989**, 31, 614-617.
- Commandeur, J. N., Stijntjes, G. J., Vermeulen, N. P., Enzymes and transport systems involved in the formation and disposition of glutathione S-conjugates. Role in bioactivation and detoxication mechanisms of xenobiotics, *Pharmacol Rev* **1995**, 47, 271-330.
- De Vleeschouwer, K., Van der Plancken, I., Van Loey, A., Hendrickx, M. E., Impact of pH on the kinetics of acrylamide formation/elimination reactions in model systems, *J Agric Food Chem* **2006**, 54, 7847-7855.
- Dearfield, K. L., Douglas, G. R., Ehling, U. H., Moore, M. M., Sega, G. A., Brusick, D. J., Acrylamide: a review of its genotoxicity and an assessment of heritable genetic risk, *Mutat Res* **1995**, 330, 71-99.
- Dixit, R., Das, M., Seth, P. K., Mukhtar, H., Interaction of acrylamide with bovine serum albumin, *Environ Res* **1986**, 40, 365-371.
- Doerge, D. R., da Costa, G. G., McDaniel, L. P., Churchwell, M. I., Twaddle, N. C., Beland, F. A., DNA adducts derived from administration of acrylamide and glycidamide to mice and rats, *Mutat Res* **2005a**, 580, 131-141.

- Doerge, D. R., Young, J. F., Chen, J. J., Dinovi, M. J., Henry, S. H., Using dietary exposure and physiologically based pharmacokinetic/pharmacodynamic modeling in human risk extrapolations for acrylamide toxicity, *J Agric Food Chem* **2008**, *56*, 6031-6038.
- Doerge, D. R., Young, J. F., McDaniel, L. P., Twaddle, N. C., Churchwell, M. I., Toxicokinetics of acrylamide and glycidamide in Fischer 344 rats, *Toxicol Appl Pharmacol* **2005b**, *208*, 199-209.
- Doroshenko, O., Fuhr, U., Kunz, D., Frank, D., Kinzig, M., Jetter, A., Reith, Y., Lazar, A., Taubert, D., Kirchheiner, J., Baum, M., Eisenbrand, G., Berger, F., Bertow, D., Berkessel, A., Sörgel, F., Schömig, E., Tomalik-Scharte, D., In vivo Role of CYP2E1 and Glutathione-S-Transferases Activity for Acrylamide Toxicokinetics in Humans, *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* **2008**.
- Dybing, E., Doe, J., Groten, J., Kleiner, J., O'Brien, J., Renwick, A. G., Schlatter, J., Steinberg, P., Tritscher, A., Walker, R., Younes, M., Hazard characterisation of chemicals in food and diet. dose response, mechanisms and extrapolation issues, *Food Chem Toxicol* **2002**, *40*, 237-282.
- Dybing, E., Sanner, T., Risk assessment of acrylamide in foods, *Toxicol Sci* **2003**, *75*, 7-15.
- Edman, P., Method for Determination of the Amino Acid Sequence in Peptides, *Acta Chemica Scandinavica* **1950**, *4*, 283-293.
- Edman, P., Phenylthiohydantoin in protein analysis, *Ann N Y Acad Sci* **1960**, *88*, 602-610.
- Ehling, S., Hengel, M., Shibamoto, T., Formation of Acrylamide from Lipids, *Chemistry and Safety of Acrylamide in Food* **2005**, 223-233.
- Ehrenberg, L., Tornqvist, M., Human health risk assessment and biological reactive intermediates: hemoglobin binding, *Adv Exp Med Biol* **1991**, *283*, 641-647.
- Eisenbrand, G., Metzler, M., Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner, 2. ed., WILEY-VCH Verlag GmbH, **2002**.
- Emery, M. G., Jubert, C., Thummel, K. E., Kharasch, E. D., Duration of cytochrome P-450 2E1 (CYP2E1) inhibition and estimation of functional CYP2E1 enzyme half-life after single-dose disulfiram administration in humans, *J Pharmacol Exp Ther* **1999**, *291*, 213-219.
- European Commission, Risk Assessment Report, Acrylamide, First Priority List, **2002**, 24.
- Fennell, T. R., Friedman, M. A., Comparison of acrylamide metabolism in humans and rodents, *Adv Exp Med Biol* **2005**, *561*, 109-116.
- Fennell, T. R., Snyder, R. W., Krol, W. L., Sumner, S. C., Comparison of the hemoglobin adducts formed by administration of N-methylolacrylamide and acrylamide to rats, *Toxicol Sci* **2003**, *71*, 164-175.
- Fennell, T. R., Sumner, S. C., Snyder, R. W., Burgess, J., Friedman, M. A., Kinetics of elimination of urinary metabolites of acrylamide in humans, *Toxicol Sci* **2006**, *93*, 256-267.
- Fennell, T. R., Sumner, S. C., Snyder, R. W., Burgess, J., Spicer, R., Bridson, W. E., Friedman, M. A., Metabolism and hemoglobin adduct formation of acrylamide in humans, *Toxicol Sci* **2005**, *85*, 447-459.
- Friedman, M., Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review, *J Agric Food Chem* **2003**, *51*, 4504-4526.
- Friedman, M., Romersberger, J., Relative Influences of Electron-Withdrawing Functional Groups on Basicities of Amino Acid Derivatives, *The Journal of Organic Chemistry* **1967**, 154-158.
- Friedman, M. A., Dulak, L. H., Stedham, M. A., A lifetime oncogenicity study in rats with acrylamide, *Fundam Appl Toxicol* **1995**, *27*, 95-105.
- Frye, R. F., Branch, R. A., Effect of chronic disulfiram administration on the activities of CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, and N-acetyltransferase in healthy human subjects, *Br J Clin Pharmacol* **2002**, *53*, 155-162.
- Fuhr, U., Boettcher, M. I., Kinzig-Schippers, M., Weyer, A., Jetter, A., Lazar, A., Taubert, D., Tomalik-Scharte, D., Pournara, P., Jakob, V., Harlfinger, S., Klaassen, T., Berkessel, A., Angerer, J., Sörgel, F., Schömig, E., Toxicokinetics of acrylamide in humans after ingestion of a defined dose in a test meal to improve risk assessment for acrylamide carcinogenicity, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2006**, *15*, 266-271.

- Fuhr, U., Schömig, E., Clinical study protocol, *Universität zu Köln*, Köln, **2005**
- Fuhr, U., Tomalik-Scharte, D., Bedeutung der CYP2E1-Aktivität für die Toxikokinetik von Acrylamid beim Menschen - Neuantrag auf DFG-Sachbeihilfe, *Universität zu Köln*, Köln, **2006**
- Galvani, M., Hamdan, M., Herbert, B., Righetti, P. G., Alkylation kinetics of proteins in preparation for two-dimensional maps: a matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry investigation, *Electrophoresis* **2001**, *22*, 2058-2065.
- Gamboa da Costa, G., Churchwell, M. I., Hamilton, L. P., Von Tungeln, L. S., Beland, F. A., Marques, M. M., Doerge, D. R., DNA adduct formation from acrylamide via conversion to glycidamide in adult and neonatal mice, *Chem Res Toxicol* **2003**, *16*, 1328-1337.
- Generoso, W. M., Sega, G. A., Lockhart, A. M., Hughes, L. A., Cain, K. T., Cacheiro, N. L., Shelby, M. D., Dominant lethal mutations, heritable translocations, and unscheduled DNA synthesis induced in male mouse germ cells by glycidamide, a metabolite of acrylamide, *Mutat Res* **1996**, *371*, 175-183.
- Gertz, C. K., S., Analysis of acrylamide and mechanisms of its formation in deep-fried products, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2002**, *104*, 762-771.
- Ghanayem, B. I., McDaniel, L. P., Churchwell, M. I., Twaddle, N. C., Snyder, R., Fennell, T. R., Doerge, D. R., Role of CYP2E1 in the epoxidation of acrylamide to glycidamide and formation of DNA and hemoglobin adducts, *Toxicol Sci* **2005**, *88*, 311-318.
- Gottwald, W., Statistik für Anwender, Wiley-VCH-Verlag, **2000**.
- Granvogl, M., Koehler, P., Latzer, L., Schieberle, P., Development of a stable isotope dilution assay for the quantitation of glycidamide and its application to foods and model systems, *J Agric Food Chem* **2008**, *56*, 6087-6092.
- Granvogl, M., Schieberle, P., Thermally generated 3-aminopropionamide as a transient intermediate in the formation of acrylamide, *J Agric Food Chem* **2006**, *54*, 5933-5938.
- Grivas, S., Jägerstad, M., Lingnert, H., Skog, K., Tornqvist, M., Aman, P., ACYRLAMIDE IN FOOD - Mechanisms of formation and influencing factors during heating of foods, **2002**
- Hagmar, L., Tornqvist, M., Nordander, C., Rosen, I., Bruze, M., Kautiainen, A., Magnusson, A. L., Malmberg, B., Aprea, P., Granath, F., Axmon, A., Health effects of occupational exposure to acrylamide using hemoglobin adducts as biomarkers of internal dose, *Scand J Work Environ Health* **2001**, *27*, 219-226.
- Hamdan, M., Bordini, E., Galvani, M., Righetti, P. G., Protein alkylation by acrylamide, its N-substituted derivatives and cross-linkers and its relevance to proteomics: a matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry study, *Electrophoresis* **2001**, *22*, 1633-1644.
- Hartmann, E. C., Boettcher, M. I., Bolt, H. M., Drexler, H., Angerer, J., N-Acetyl-S-(1-carbamoyl-2-hydroxy-ethyl)-L: -cysteine (iso-GAMA) a further product of human metabolism of acrylamide: comparison with the simultaneously excreted other mercaptuic acids, *Arch Toxicol* **2008a**.
- Hartmann, E. C., Boettcher, M. I., Schettgen, T., Fromme, H., Drexler, H., Angerer, J., Hemoglobin adducts and mercapturic acid excretion of acrylamide and glycidamide in one study population, *J Agric Food Chem* **2008b**, *56*, 6061-6068.
- Hoffbrand, A. V., Petitt, J. E., Moss, P. A. H., Hoelzer, D., Grundkurs Hämatologie, 2. ed., Blackwell Verlag, **2003**.
- Hübschmann, H. J., Handbuch der GC/MS, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, **1996**.
- IARC, Monographs on the Evaluation of Carcinogen Risk to Humans: Some Industrial Chemicals, Vol. 60, International Agency for Research on Cancer, Lyon, **1994**.
- Jeffrey, A. M., Williams, G. M., Risk assessment of DNA-reactive carcinogens in food, *Toxicol Appl Pharmacol* **2005**, *207*, 628-635.
- Johnson, K. A., Gorzinski, S. J., Bodner, K. M., Campbell, R. A., Wolf, C. H., Friedman, M. A., Mast, R. W., Chronic toxicity and oncogenicity study on acrylamide incorporated in the drinking water of Fischer 344 rats, *Toxicol Appl Pharmacol* **1986**, *85*, 154-168.
- Jones, D. P., Carlson, J. L., Samiec, P. S., Sternberg, P., Jr., Mody, V. C., Jr., Reed, R. L., Brown, L. A., Glutathione measurement in human plasma. Evaluation of sample

- collection, storage and derivatization conditions for analysis of dansyl derivatives by HPLC, *Clin Chim Acta* **1998**, 275, 175-184.
- Jones, K., Garfitt, S., Emms, V., Warren, N., Cocker, J., Farmer, P., Correlation of haemoglobin-acrylamide adducts with airborne exposure: an occupational survey, *Toxicol Lett* **2006**, 162, 174-180.
- Kellert, M., Scholz, K., Wagner, S., Dekant, W., Volkel, W., Quantitation of mercapturic acids from acrylamide and glycidamide in human urine using a column switching tool with two trap columns and electrospray tandem mass spectrometry, *J Chromatogr A* **2006**, 1131, 58-66.
- Kharasch, E. D., Thummel, K. E., Mhyre, J., Lillibridge, J. H., Single-dose disulfiram inhibition of chlorzoxazone metabolism: a clinical probe for P450 2E1, *Clin Pharmacol Ther* **1993**, 53, 643-650.
- Kienzle, E., Ranz, D., Thielen, C., Jezussek, M., Schieberle, P., Carry over (transfer) of feed-borne acrylamide into eggs, muscle, serum, and faeces - a pilot study with Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*), *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* **2005**, 89, 79-83.
- Klaunig, J. E., Acrylamide carcinogenicity, *J Agric Food Chem* **2008**, 56, 5984-5988.
- Kurebayashi, H., Ohno, Y., Metabolism of acrylamide to glycidamide and their cytotoxicity in isolated rat hepatocytes: protective effects of GSH precursors, *Arch Toxicol* **2006**.
- Lehmann, W., Massenspektrometrie in der Biochemie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **1996**.
- Lehning, E. J., Balaban, C. D., Ross, J. F., Reid, M. A., LoPachin, R. M., Acrylamide neuropathy. I. Spatiotemporal characteristics of nerve cell damage in rat cerebellum, *Neurotoxicology* **2002**, 23, 397-414.
- Lequin, R. M., Niall, H. D., The application of a fluorinated isothiocyanate as coupling agent in the Edman degradation, *Biochim Biophys Acta* **1972**, 257, 76-82.
- LoPachin, R. M., The changing view of acrylamide neurotoxicity, *Neurotoxicology* **2004**, 25, 617-630.
- LoPachin, R. M., DeCaprio, A. P., Protein adduct formation as a molecular mechanism in neurotoxicity, *Toxicol Sci* **2005**, 86, 214-225.
- Madle, S., Broschinski, L., Mosbach-Schulz, O., Schöning, G., Schulte, A., Zur aktuellen Risikobewertung von Acrylamid in Lebensmitteln, *Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz* **2003**, 5, 405-414.
- Maniere, I., Godard, T., Doerge, D. R., Churchwell, M. I., Guffroy, M., Laurentie, M., Poul, J. M., DNA damage and DNA adduct formation in rat tissues following oral administration of acrylamide, *Mutat Res* **2005**, 580, 119-129.
- Marquardt, H., Schäfer, S., Lehrbuch der Toxikologie, 2. ed., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, **2004**.
- Marquet, P., Progress of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical and forensic toxicology, *Ther Drug Monit* **2002**, 24, 255-276.
- Marsh, G., Lucas, L., Youk, A., Schall, L., Mortality patterns among workers exposed to acrylamide: 1994 follow up, *Occup Environ Med* **1999**, 56, 181-190.
- McCarver, D. G., Byun, R., Hines, R. N., Hichme, M., Wegenek, W., A genetic polymorphism in the regulatory sequences of human CYP2E1: association with increased chlorzoxazone hydroxylation in the presence of obesity and ethanol intake, *Toxicol Appl Pharmacol* **1998**, 152, 276-281.
- Mestdagh, F., Lachat, C., Baert, K., Moons, E., Kolsteren, P., Van Peteghem, C., De Meulenaer, B., Importance of a canteen lunch on the dietary intake of acrylamide, *Mol Nutr Food Res* **2007**, 51, 509-516.
- Miller, M. J., Carter, D. E., Sipes, I. G., Pharmacokinetics of acrylamide in Fisher-344 rats, *Toxicol Appl Pharmacol* **1982**, 63, 36-44.
- Mönkemeyer, M., Reaktion von alpha-, beta-ungesättigten Carbonylverbindungen mit Glutathion: Untersuchungen zur Reaktionskinetik mittels hochleistungsflüssigchromatographischer Verfahren - Wissenschaftliche Abschlussarbeit, *Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie, Fachbereich Chemie, Technische Universität Kaiserslautern*, **2006**

- Mottram, D. S., Wedzicha, B. L., Dodson, A. T., Acrylamide is formed in the Maillard reaction, *Nature* **2002**, 419, 448-449.
- Mowrer, J., Tornqvist, M., Jensen, S., Ehrenberg, L., Modified Edman Degradation Applied to Hemoglobin for Monitoring Occupational Exposure to Alkylating Agents, *Toxicol. Environ. Chem.* **1986**, 11, 215-231.
- Mucci, L., Dickman, P., Steineck, G., Adami, H., Augustsson, K., Dietary acrylamide and cancer of the large bowel, kidney and bladder: absence of an association in a population-based study in Sweden, *British Journal Cancer* **2002**, 88, 84-89.
- Müller-Esterl, W., Biochemie, 1. ed., Elsevier - Spektrum Akademischer Verlag, **2004**.
- Oneta, C. M., Lieber, C. S., Li, J., Ruttimann, S., Schmid, B., Lattmann, J., Rosman, A. S., Seitz, H. K., Dynamics of cytochrome P4502E1 activity in man: induction by ethanol and disappearance during withdrawal phase, *J Hepatol* **2002**, 36, 47-52.
- Osterman-Golkar, S., Ehrenberg, L., Dosimetry of electrophilic compounds by means of hemoglobin alkylation, *Annu Rev Public Health* **1983**, 4, 397-402.
- Pabst, K., Mathar, W., Palavinskias, R., Meisel, H., Bluthgen, A., Klaffke, H., Acrylamide-occurrence in mixed concentrate feed for dairy cows and carry-over into milk, *Food Addit Contam* **2005**, 22, 210-213.
- Park, J., Kamendulis, L. M., Friedman, M. A., Klaunig, J. E., Acrylamide-induced cellular transformation, *Toxicol Sci* **2002**, 65, 177-183.
- Paulsson, B., Athanassiadis, I., Rydberg, P., Tornqvist, M., Hemoglobin adducts from glycidamide: acetonization of hydrophilic groups for reproducible gas chromatography/tandem mass spectrometric analysis, *Rapid Commun Mass Spectrom* **2003a**, 17, 1859-1865.
- Paulsson, B., Grawe, J., Tornqvist, M., Hemoglobin adducts and micronucleus frequencies in mouse and rat after acrylamide or N-methylolacrylamide treatment, *Mutat Res* **2002**, 516, 101-111.
- Paulsson, B., Kotova, N., Grawé, J., Henderson, A., Granath, F., Golding, B., Tornqvist, M., Induction of micronuclei in mouse and rat by glycidamide, genotoxic metabolite of acrylamide, *Mutat Res* **2003b**, 535, 15-24.
- Paulsson, B., Larsen, K. O., Tornqvist, M., Hemoglobin adducts in the assessment of potential occupational exposure to acrylamides -- three case studies, *Scand J Work Environ Health* **2006**, 32, 154-159.
- Pelucchi, C., Franceschi, S., Levi, F., Trichopoulos, D., Bosetti, C., Negri, E., La Vecchia, C., Fried potatoes and human cancer, *Int J Cancer* **2003**, 105, 558-560.
- Perez, H. L., Cheong, H. K., Yang, J. S., Osterman-Golkar, S., Simultaneous analysis of hemoglobin adducts of acrylamide and glycidamide by gas chromatography-mass spectrometry, *Anal Biochem* **1999**, 274, 59-68.
- Raucy, J. L., Schultz, E. D., Wester, M. R., Arora, S., Johnston, D. E., Omdahl, J. L., Carpenter, S. P., Human lymphocyte cytochrome P450 2E1, a putative marker for alcohol-mediated changes in hepatic chlorzoxazone activity, *Drug Metab Dispos* **1997**, 25, 1429-1435.
- Rice, J. M., The carcinogenicity of acrylamide, *Mutat Res* **2005**, 580, 3-20.
- Richter, E., Branner, B., Biomonitoring of exposure to aromatic amines: haemoglobin adducts in humans, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2002**, 778, 49-62.
- Roberts, B. J., Song, B. J., Soh, Y., Park, S. S., Shoaf, S. E., Ethanol induces CYP2E1 by protein stabilization. Role of ubiquitin conjugation in the rapid degradation of CYP2E1, *J Biol Chem* **1995**, 270, 29632-29635.
- Ross, W. C. J., Biological Alkylating Agents, Butterworths, London, **1962**.
- Rydberg, P., Luning, B., Wachtmeister, C. A., Eriksson, L., Tornqvist, M., Applicability of a modified Edman procedure for measurement of protein adducts: mechanisms of formation and degradation of phenylthiohydantoins, *Chem Res Toxicol* **2002**, 15, 570-581.
- Rydberg, P., Luning, B., Wachtmeister, C. A., Törnqvist, M., Synthesis and Characterization of N-Substituted Valines and their Phenyl- and Pentafluorophenyl-thiohydantoins, *Acta Chemica Scandinavia* **1993**, 47, 813-817.

- Sanchez, J., Cabrer, J. M., Rossello, C. A., Palou, A., Pico, C., Formation of hemoglobin adducts of acrylamide after its ingestion in rats is dependent on age and sex, *J Agric Food Chem* **2008**, *56*, 5096-5101.
- Scherer, G., Engl, J., Urban, M., Gilch, G., Janket, D., Riedel, K., Relationship between machine-derived smoke yields and biomarkers in cigarette smokers in Germany, *Regul Toxicol Pharmacol* **2007**, *47*, 171-183.
- Schettgen, T., Broding, H. C., Angerer, J., Drexler, H., Hemoglobin adducts of ethylene oxide, propylene oxide, acrylonitrile and acrylamide-biomarkers in occupational and environmental medicine, *Toxicol Lett* **2002**, *134*, 65-70.
- Schettgen, T., Kutting, B., Hornig, M., Beckmann, M. W., Weiss, T., Drexler, H., Angerer, J., Trans-placental exposure of neonates to acrylamide--a pilot study, *Int Arch Occup Environ Health* **2004a**, *77*, 213-216.
- Schettgen, T., Rossbach, B., Kutting, B., Letzel, S., Drexler, H., Angerer, J., Determination of haemoglobin adducts of acrylamide and glycidamide in smoking and non-smoking persons of the general population, *Int J Hyg Environ Health* **2004b**, *207*, 531-539.
- Segerback, D., Calleman, C. J., Schroeder, J. L., Costa, L. G., Faustman, E. M., Formation of N-7-(2-carbamoyl-2-hydroxyethyl)guanine in DNA of the mouse and the rat following intraperitoneal administration of [¹⁴C]acrylamide, *Carcinogenesis* **1995**, *16*, 1161-1165.
- Smith, C. J., Perfetti, T. A., Rumple, M. A., Rodgman, A., Doolittle, D. J., "IARC group 2A Carcinogens" reported in cigarette mainstream smoke, *Food Chem Toxicol* **2000**, *38*, 371-383.
- Sobel, W., Bond, G., Parsons, T., Brenner, F., Acrylamide cohort mortality study, *Brit Ind Med* **1986**, *43*, 785-788.
- Solomon, J. J., Fedyk, J., Mukai, F., Segal, A., Direct alkylation of 2'-deoxynucleosides and DNA following in vitro reaction with acrylamide, *Cancer Res.* **1985**, *45*, 3465-3470.
- Sorgel, F., Weissenbacher, R., Kinzig-Schippers, M., Hofmann, A., Illauer, M., Skott, A., Landersdorfer, C., Acrylamide: increased concentrations in homemade food and first evidence of its variable absorption from food, variable metabolism and placental and breast milk transfer in humans, *Chemotherapy* **2002**, *48*, 267-274.
- Stadler, R. H., Blank, I., Varga, N., Robert, F., Hau, J., Guy, P. A., Robert, M. C., Riediker, S., Acrylamide from Maillard reaction products, *Nature* **2002**, *419*, 449-450.
- Stadler, R. H., Robert, F., Riediker, S., Varga, N., Davidek, T., Devaud, S., Goldmann, T., Hau, J., Blank, I., In-depth mechanistic study on the formation of acrylamide and other vinylogous compounds by the maillard reaction, *J Agric Food Chem* **2004**, *52*, 5550-5558.
- Sumner, S. C., Fennell, T. R., Moore, T. A., Chanas, B., Gonzalez, F., Ghanayem, B. I., Role of cytochrome P450 2E1 in the metabolism of acrylamide and acrylonitrile in mice, *Chem Res Toxicol* **1999**, *12*, 1110-1116.
- Sumner, S. C., MacNeela, J. P., Fennell, T. R., Characterization and quantitation of urinary metabolites of [1,2,3-¹³C]acrylamide in rats and mice using ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Chem Res Toxicol* **1992**, *5*, 81-89.
- Sumner, S. C., Selvaraj, L., Nauhaus, S. K., Fennell, T. R., Urinary metabolites from F344 rats and B6C3F1 mice coadministered acrylamide and acrylonitrile for 1 or 5 days, *Chem Res Toxicol* **1997**, *10*, 1152-1160.
- Sumner, S. C., Williams, C. C., Snyder, R. W., Krol, W. L., Asgharian, B., Fennell, T. R., Acrylamide: a comparison of metabolism and hemoglobin adducts in rodents following dermal, intraperitoneal, oral, or inhalation exposure, *Toxicol Sci* **2003**, *75*, 260-270.
- Taeymans, D., Andersson, A., Ashby, P., Blank, I., Gonde, P., van Eijck, P., Faivre, V., Lalljie, S. P., Lingnert, H., Lindblom, M., Matissek, R., Muller, D., Stadler, R. H., Studer, A., Silvani, D., Tallmadge, D., Thompson, G., Whitmore, T., Wood, J., Zyzak, D., Acrylamide: update on selected research activities conducted by the European food and drink industry, *J AOAC Int* **2005**, *88*, 234-241.
- Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S., Tornqvist, M., Acrylamide: a cooking carcinogen? *Chem Res Toxicol* **2000**, *13*, 517-522.

- Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S., Tornqvist, M., Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs, *J Agric Food Chem* **2002**, *50*, 4998-5006.
- Tareke, E., Twaddle, N. C., McDaniel, L. P., Churchwell, M. I., Young, J. F., Doerge, D. R., Relationships between biomarkers of exposure and toxicokinetics in Fischer 344 rats and B6C3F1 mice administered single doses of acrylamide and glycidamide and multiple doses of acrylamide, *Toxicol Appl Pharmacol* **2006**, *217*, 63-75.
- Thielen, S., Charakterisierung DNA-schädigender Wirkungen mittels Comet Assay und hPRT-Genmutations-Assay: Ein Vergleich zwischen α,β -ungesättigten Carbonylverbindungen, Epoxiden und N-Nitroso-verbindungen, TU Kaiserslautern, **2008**.
- Thielen, S., Baum, M., Hoffmann, M., Loeppky, R. N., Eisenbrand, G., Genotoxicity of glycidamide in comparison to (+/-)-anti-benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide and α -acetoxy-N-nitroso-diethanolamine in human blood and in mammalian V79-cells, *Mol Nutr Food Res* **2006**, *50*, 430-436.
- Tong, G. C., Cornwell, W. K., Means, G. E., Reactions of acrylamide with glutathione and serum albumin, *Toxicol Lett* **2004**, *147*, 127-131.
- Tornqvist, M., Epoxide adducts to N-terminal valine of hemoglobin., *METHODS IN ENZYMOLOGY* **1994**, *231*, 650-657.
- Tornqvist, M., Formation of reactive species that lead to hemoglobin adducts during storage of blood samples, *Carcinogenesis* **1990**, *11*, 51-54.
- Tornqvist, M., Fred, C., Haglund, J., Helleberg, H., Paulsson, B., Rydberg, P., Protein adducts: quantitative and qualitative aspects of their formation, analysis and applications, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2002**, *778*, 279-308.
- Tornqvist, M., Paulsson, B., Vikstrom, A. C., Granath, F., Approach for cancer risk estimation of acrylamide in food on the basis of animal cancer tests and in vivo dosimetry, *J Agric Food Chem* **2008**, *56*, 6004-6012.
- Tsutsumi, M., Lasker, J. M., Takahashi, T., Lieber, C. S., In vivo induction of hepatic P450E1 by ethanol: role of increased enzyme synthesis, *Arch Biochem Biophys* **1993**, *304*, 209-218.
- Tyl, R. W., Friedman, M. A., Effects of acrylamide on rodent reproductive performance, *Reprod Toxicol* **2003**, *17*, 1-13.
- Umweltbundesamt, Acrylamid und Human-Biomonitoring, *Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz* **2008**, *51*, 98-108.
- Van Landingham, C. B., Lawrence, G. A., Shipp, A. M., Estimates of Lifetime-Absorbed Daily Doses from the Use of Personal-Care Products Containing Polyacrylamide: A Monte Carlo Analysis, *Risk Analysis* **2004**, *24*, 603-619.
- Vesper, H. W., Licea-Perez, H., Meyers, T., Ospina, M., Myers, G. L., Pilot study on the impact of potato chips consumption on biomarkers of acrylamide exposure, *Adv Exp Med Biol* **2005**, *561*, 89-96.
- Vesper, H. W., Ospina, M., Meyers, T., Ingham, L., Smith, A., Gray, J. G., Myers, G. L., Automated method for measuring globin adducts of acrylamide and glycidamide at optimized Edman reaction conditions, *Rapid Commun Mass Spectrom* **2006**, *20*, 959-964.
- Vesper, H. W., Slimani, N., Hallmans, G., Tjonneland, A., Agudo, A., Benetou, V., Bingham, S., Boeing, H., Boutron-Ruault, M. C., Bueno-de-Mesquita, H. B., Chirlaque, D., Clavel-Chapelon, F., Crowe, F., Drogan, D., Ferrari, P., Johansson, I., Kaaks, R., Linseisen, J., Lund, E., Manjer, J., Mattiello, A., Palli, D., Peeters, P. H., Rinaldi, S., Skeie, G., Trichopoulou, A., Vineis, P., Wirfalt, E., Overvad, K., Stromberg, U., Cross-sectional study on acrylamide hemoglobin adducts in subpopulations from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) Study, *J Agric Food Chem* **2008**, *56*, 6046-6053.
- Watson, W. P., Mutti, A., Role of biomarkers in monitoring exposures to chemicals: present position, future prospects, *Biomarkers* **2004**, *9*, 211-242.
- WHO, Health implications of acrylamide in food. Report of a Joint FAO/WHO consultation, **2002**.

- WHO, Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) Sixty-fourth Meeting. Summary and conclusions., **2005**, www.who.int/ipcs/food/jecfa/summaries/en.
- Wilson, K. M., Vesper, H. W., Tocco, P., Sampson, L., Rosen, J., Hellenas, K. E., Tornqvist, M., Willett, W. C., Validation of a food frequency questionnaire measurement of dietary acrylamide intake using hemoglobin adducts of acrylamide and glycidamide, *Cancer Causes Control* **2008**.
- Wu, X., Shi, H., Jiang, H., Kemp, B., Hong, W. K., Delclos, G. L., Spitz, M. R., Associations between cytochrome P4502E1 genotype, mutagen sensitivity, cigarette smoking and susceptibility to lung cancer, *Carcinogenesis* **1997**, *18*, 967-973.
- Xie, Q., Liu, Y., Sun, H., Liu, Y., Ding, X., Fu, D., Liu, K., Du, X., Jia, G., Inhibition of acrylamide toxicity in mice by three dietary constituents, *J Agric Food Chem* **2008**, *56*, 6054-6060.
- Xie, Q., Sun, H., Liu, Y., Ding, X., Fu, D., Liu, K., Adduction of biomacromolecules with acrylamide (AA) in mice at environmental dose levels studied by accelerator mass spectrometry, *Toxicol Lett* **2006**, *163*, 101-108.
- Yaylayan, V. A., Wnorowski, A., Perez Locas, C., Why asparagine needs carbohydrates to generate acrylamide, *J Agric Food Chem* **2003**, *51*, 1753-1757.
- Zeynep Atay, N., Calgan, D., Özakat, E., Varnali, T., Acrylamide and glycidamide adducts of Guanine, *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* **2005**, *728*, 249-251.
- Zyzak, D. V., Sanders, R. A., Stojanovic, M., Tallmadge, D. H., Eberhart, B. L., Ewald, D. K., Gruber, D. C., Morsch, T. R., Strothers, M. A., Rizzi, G. P., Villagran, M. D., Acrylamide formation mechanism in heated foods, *J Agric Food Chem* **2003**, *51*, 4782-4787.

Anhang

1.	¹ H-NMR-Spektren.....	I
1.1.	AA-ValPFPPTH.....	I
1.2.	AAVal.....	II
1.3.	AAd ₈ Val	III
1.4.	GAVal	IV
1.5.	GAd ₈ Val	V
1.6.	BOC-d ₈ Val	VI
1.7.	BOC-Valyl-leucin-p-nitroanilid.....	VII
2.	Etablierung des Edman-Abbaus.....	VIII
2.1.	LC/MS/MS Methodik.....	VIII
2.1.1.	Kalibriergeraden für Nachweis- und Bestimmungsgrenzen.....	VIII
2.1.2.	Linearität	IX
2.2.	GC/MS Methodik.....	IX
2.2.1.	Kalibriergeraden für Nachweis- und Bestimmungsgrenzen.....	IX
2.2.2.	Nachweis- und Bestimmungsgrenze in der Probenmatrix.....	X
2.2.3.	Bestimmung der Varianzen.....	XI
2.2.4.	Alternative Probenaufarbeitungen.....	XIII
3.	Bestimmung der Addukte von Acrylamid und Glycidamid mit dem N-terminalen Valin des Hämoglobin.....	XVI
3.1.	Dosimetrie mittels LC/MS/MS	XVI
3.1.1.	AAVal.....	XVI
3.1.2.	GAVal	XIX
3.2.	Hintergrundbelastungen von AAVal/GAVal mittels GC/MS.....	XXII
3.2.1.	Nichtraucher	XXII
3.2.2.	Raucher	XXV
3.3.	Dosimetrie mittels GC/MS.....	I
3.3.1.	AAVal.....	I
3.3.2.	GAVal	III
3.4.	In vivo Adduktbildung von Acrylamid und Glycidamid mit dem N-terminalen Valin des Hämoglobins im Rahmen der humanen Verzehrsstudie „Bedeutung der CYP2E1-Aktivität für die Toxikokinetik von Acrylamid beim Menschen“ ...	VI
3.4.1.	Proband 04	VI
3.4.2.	Proband 07	IX
3.4.3.	Proband 10	XII
3.4.4.	Statistische Auswertung.....	XVI
4.	Verteilung von ¹⁴ C-Acrylamid in humanem Vollblut	I
4.1.	Inkubationen mit 3 µM ¹⁴ C-Acrylamid	I
4.2.	Inkubationen mit 30 µM ¹⁴ C-Acrylamid	VII
4.2.1.	Versuche ohne Auftrennung der Erythrozytenfraktion.....	VII
4.2.2.	Versuche mit Auftrennung der Erythrozytenfraktion.....	XIV
4.3.	Korrekturfaktoren für LSC-Messwerte.....	XVII
5.	Lebenslauf	XVIII
6.	Posterbeiträge und Publikationen	XIX

1. ^1H -NMR-Spektren

1.1. AA-ValPFPTH

AA-ValPFPTH ist der bei Durchführung des modifizierten Edmanabbaus aus dem Addukt des Acrylamid mit dem N-terminalen Valin des Hämoglobins generierte Analyt.

(Gesamt-) Ausbeute: 13,6 %

DC-Kontrolle: n-Hexan/Ethylacetat 1/7 (v/v), R_f : 0,4

Elementaranalyse: ber. C 45,57 % H 3,57 % N 10,63 %

gef. C 45,87 % H 3,56 % N 10,50 %

LC/MS (neg. APCI): 394,2 m/z ($[\text{M}-\text{H}]^-$)

Charakterisierung mittels ^1H -NMR:

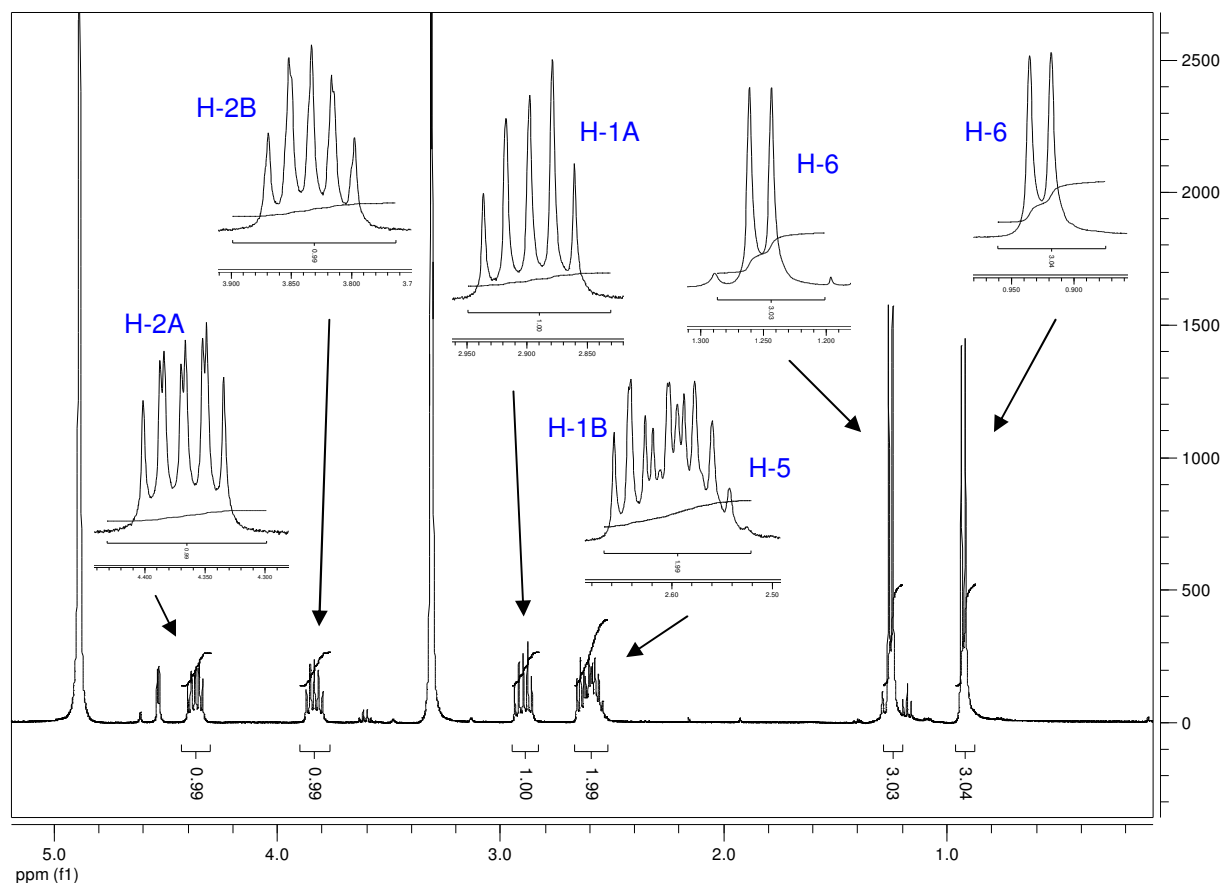
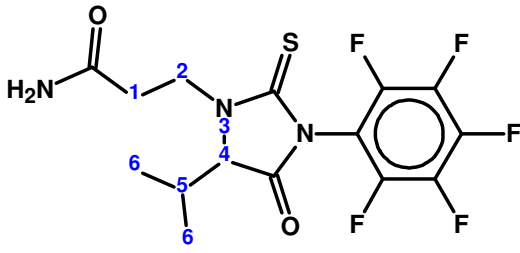


Abbildung: Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum von AA-Val-PFPTH (400.13 MHz, d_4 -Methanol, δ in ppm, 298 K) von 0.2-5.0 ppm

δ [ppm]	Charakterisierung	
0,918-0,936; 1,244-1,261	dd, 6 H, H-6	
2,543-2,658	m, 2 H, H-5 , H-1B	
2,861-2,936	m, 1 H, H-1A	
3,797-3,869	m, 1H, H-2B	
4,335-4,402	m, 1H, H-2A	
H-4 vermutlich von d ₄ -MeOH überdeckt.		

Ausbeute: 806 mg (77 %; 2,04 mmol); weißer Feststoff

1.2. AAVal

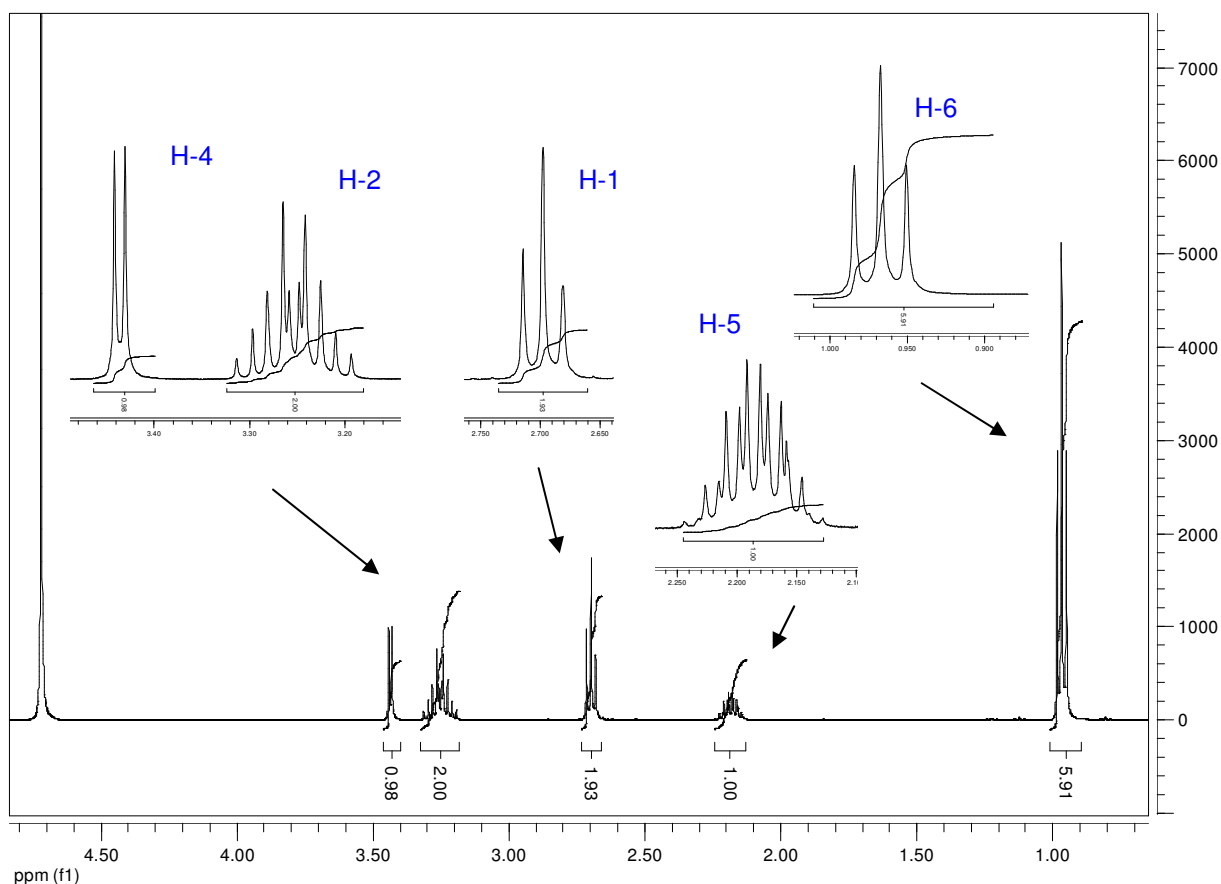


Abbildung: Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum von AAVal (400.13 MHz, D_2O , δ in ppm, 298 K) von 0.7-4.8 ppm

1.4. GAVal

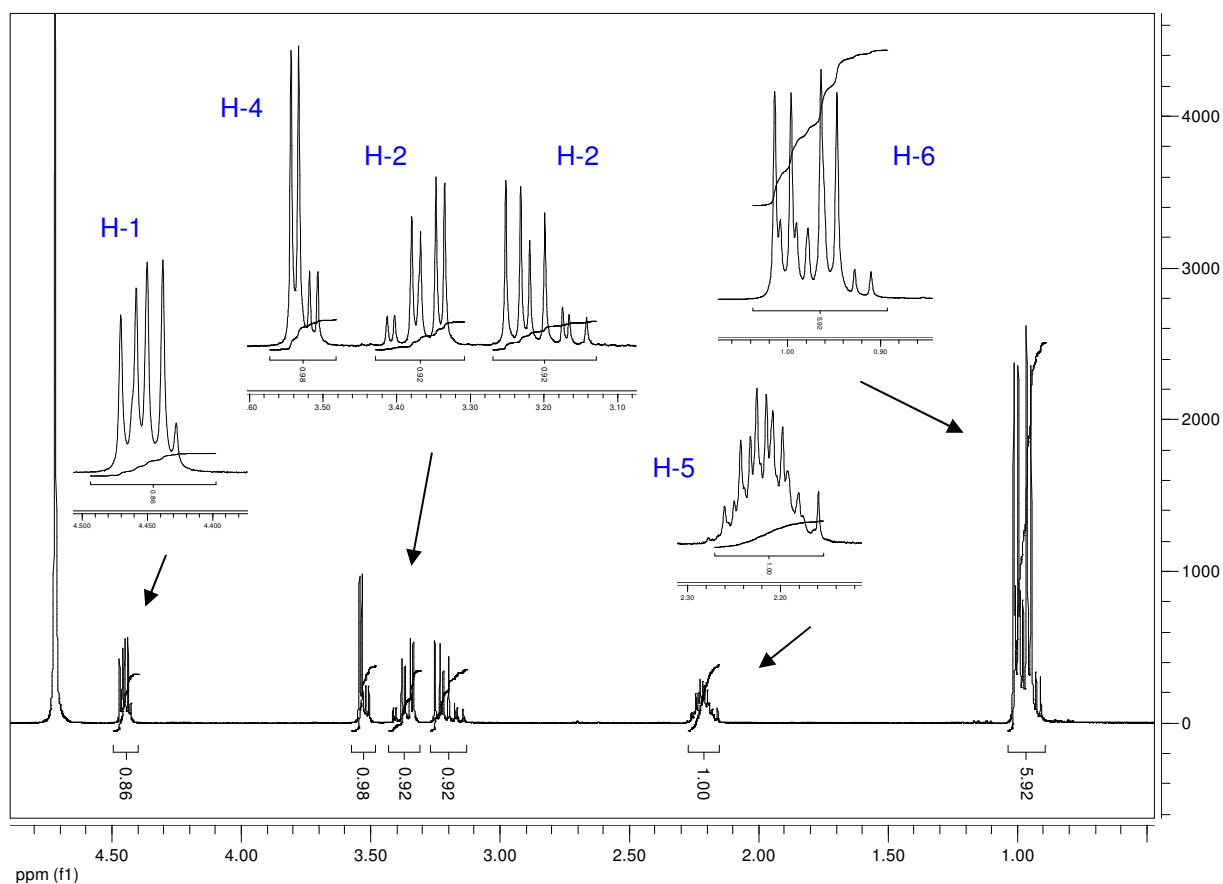
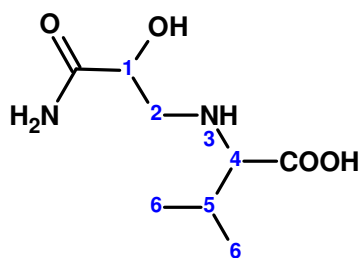


Abbildung: Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum von GAVal (400.13 MHz, D_2O , δ in ppm, 298 K) von 0.5-4.8 ppm

δ [ppm]	Charakterisierung
0,91-1,01	m, 6 H, H-6
2,16-2,26	m, 1 H, H-5
3,14-3,25	m, 1 H, H-2
3,34-3,41	m, 1 H, H-2
3,51-3,54	m, 1 H, H-4
4,43-4,47	m, 1 H, H-1



Ausbeute: 863,8 mg (43,0 %; 4,23 mmol); weißer Feststoff

1.5. GAd_8Val

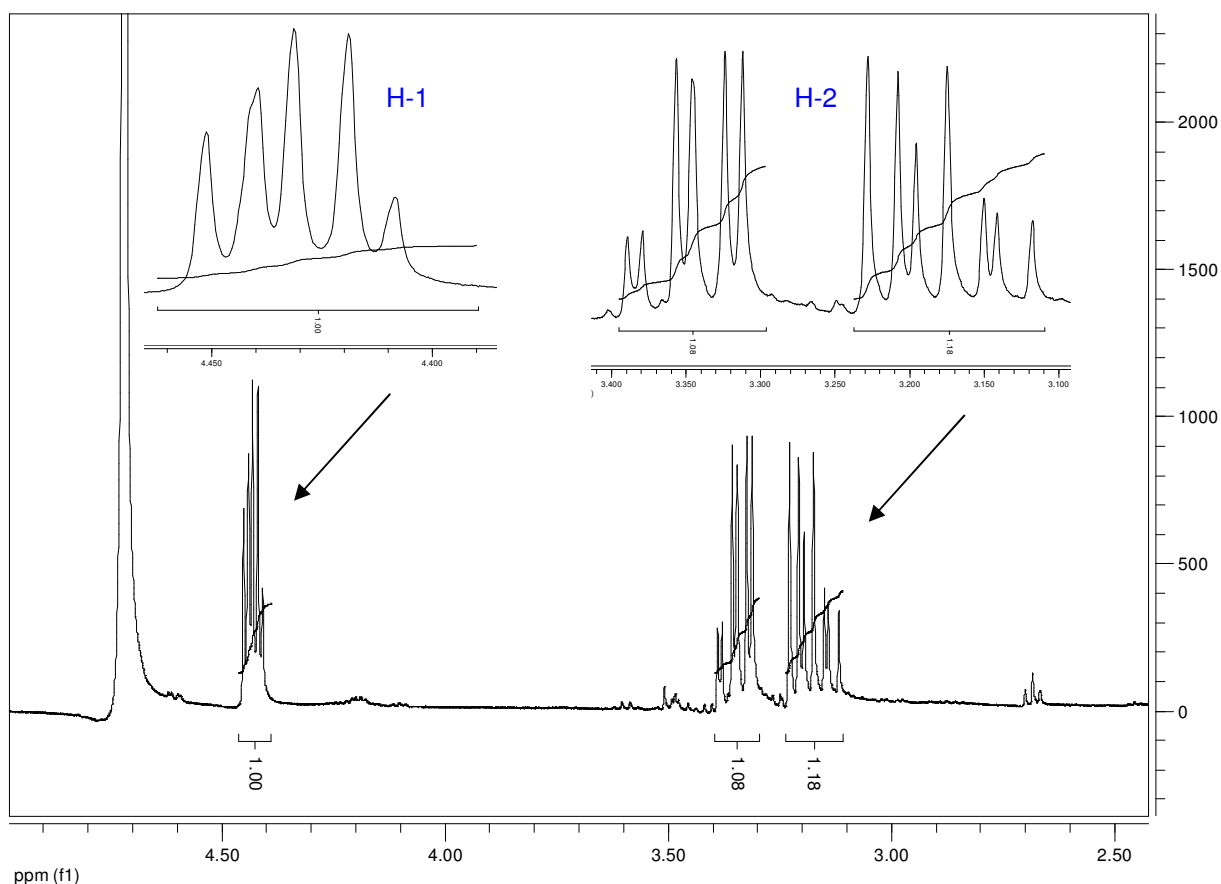
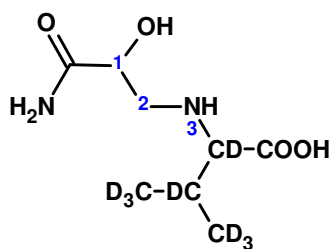


Abbildung: Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum von GAd_8Val (400.13 MHz, D_2O , δ in ppm, 298 K) von 2.5-4.9 ppm

δ [ppm]	Charakterisierung
3,12-3,23	m, 1 H, H-2
3,31-3,39	m, 1 H, H-2
4,41-4,45	m, 1 H, H-1



Ausbeute: 323 mg (82,3 %; 1,64 mmol); hygroskopischer weißer Feststoff

1.6. BOC-d₈Val

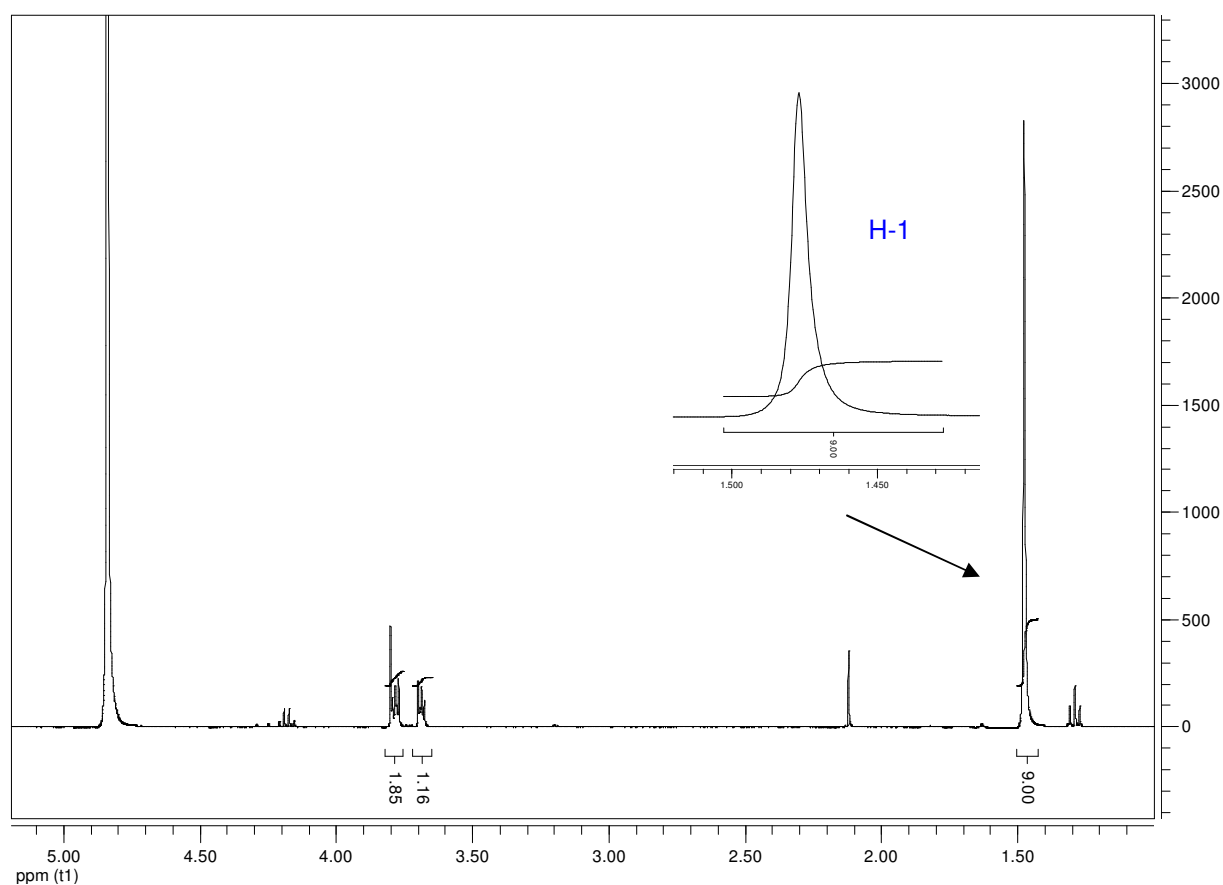


Abbildung: Ausschnitt aus dem ¹H-NMR-Spektrum von BOC-d₈Val (400.13 MHz, d₄-MeOH, δ in ppm, 298 K) von 1.1-5.1 ppm

δ [ppm]	Charakterisierung	<chem>CC(C)(C)OC(=O)NC(C)(C)C(=O)O</chem>
1,477	s, 9 H, H-1	

Ausbeute: 2,75 g (98,8 %; 12,65 mmol); weißer Feststoff

1.7. BOC-Valyl-leucin-p-nitroanilid

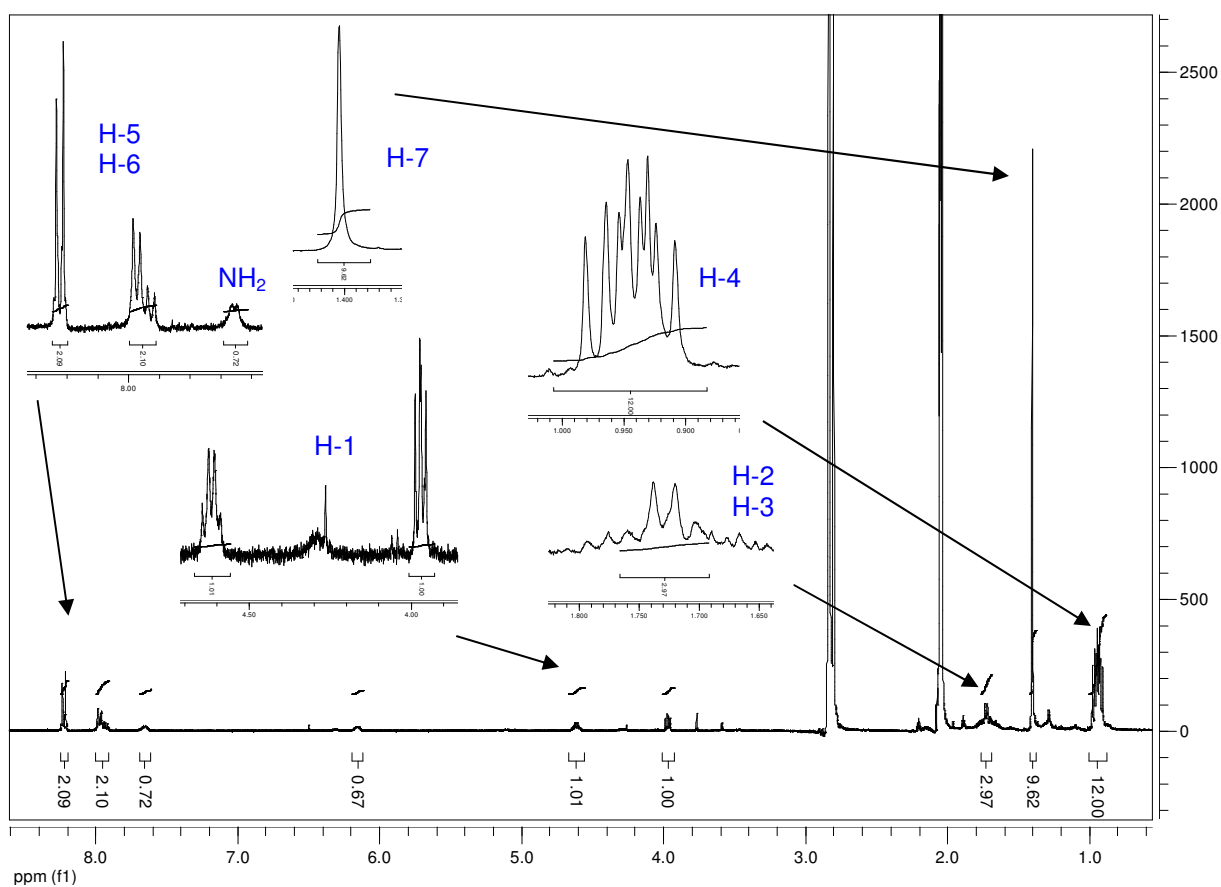
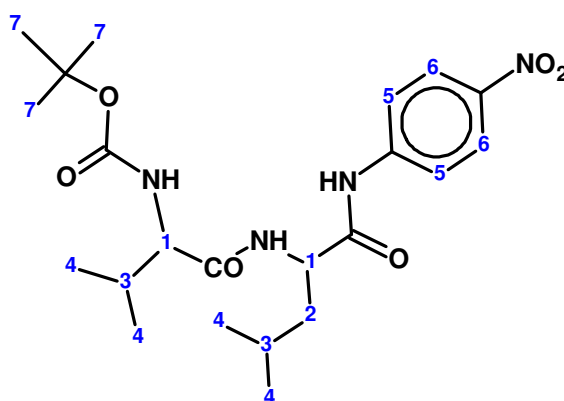


Abbildung: Ausschnitt aus dem ^1H -NMR-Spektrum von BOC-Valyl-leucin-p-nitroanilid (400.13 MHz, d_4 -MeOH, δ in ppm, 298 K) von 0.8-8.3 ppm

δ [ppm]	Charakterisierung
0,91-0,98	m, 12 H, H-4
1,41	s, 9 H, H-7
1,67-1,79	m, 3-4 H, H-2, H-3
3,95-3,99	m, 1 H, H-1
4,59-4,65	m, 1 H, H-1
7,65-7,66	m, 1 H, NH_2
7,92-8,24	m, 4 H, H-5, H-6

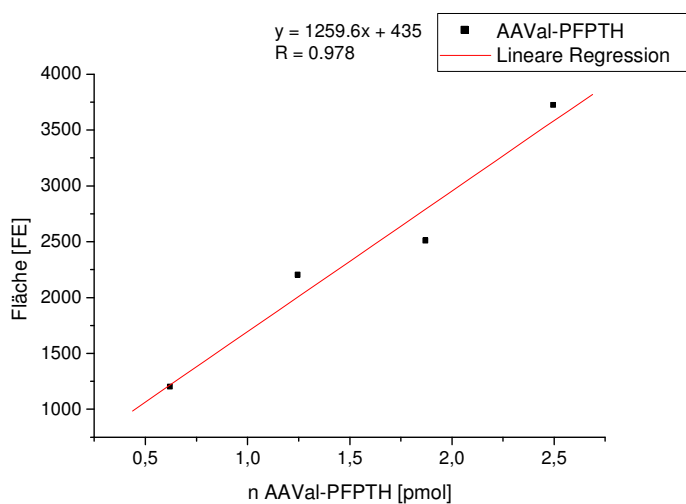


2. Etablierung des Edman-Abbaus

2.1. LC/MS/MS Methodik

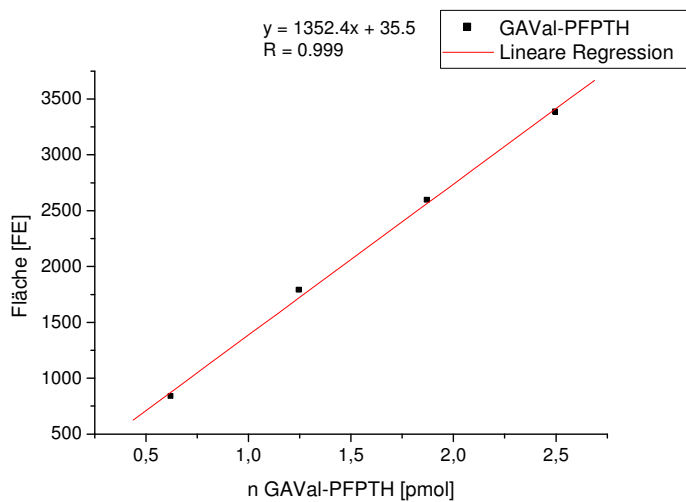
2.1.1. Kalibriergeraden für Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

AAVal-PFPTH



n [pmol]	c [nM]	Fläche [FE]
0,625	25	1195
1,25	50	2197,5
1,875	75	2502,5
2,5	100	3717,5

GAVal-PFPTH



n [pmol]	c [nM]	Fläche [FE]
0,625	25	833
1,25	50	1785
1,875	75	2590
2,5	100	3380

2.1.2. Linearität

AAVal-PFPTH

n [pmol]	c [nM]	Fläche
0,25	10	8470
2,5	100	41800
25	1000	94000
250	10000	656000
2500	100000	6510000
25000	1000000	50600000

$$y = 2595,5x + 20144$$

$$R = 0.999$$

GAVal-PFPTH

n [pmol]	c [nM]	Fläche
0,25	10	503
2,5	100	3240
25	1000	34200
250	10000	391000
2500	100000	4990000
25000	1000000	20300000

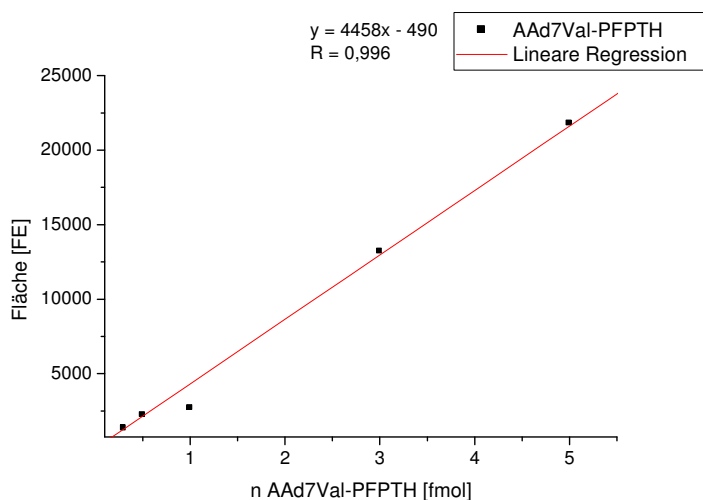
$$y = 2004,9x - 30015$$

$$R = 0.999$$

2.2. GC/MS Methodik

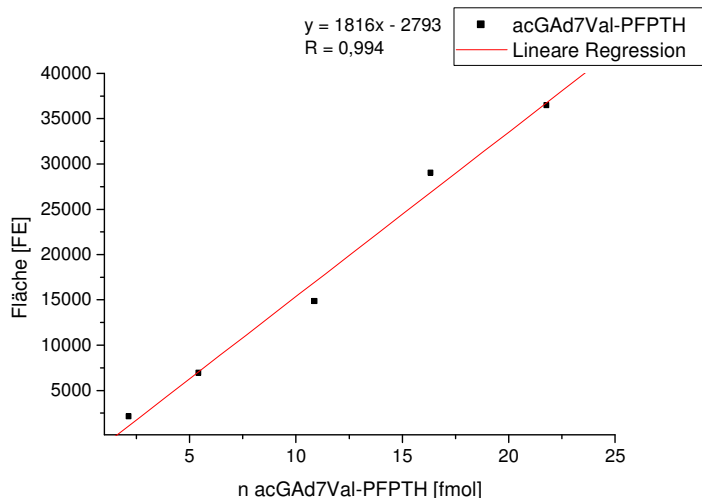
2.2.1. Kalibriergeraden für Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

AAd₇Val-PFPTH



n [fmol]	Fläche [FE]
0,3	1334,5
0,5	2219
1,0	2704,5
3,0	13193
5,0	21795

acGAd7Val-PFPTH



n [fmol]	Fläche [FE]
2,18	2062
5,45	6853
10,91	14769
16,36	28937
21,81	36391

2.2.2. Nachweis- und Bestimmungsgrenze in der Probenmatrix

AAVal

	Messung 1	Messung 2	+ 1µl Messung 1	+ 2µl Messung 1	+ 3µl Messung 1	+ 4µl Messung 1	+ 5µl Messung 1	+ 6µl Messung 1	+ 7µl Messung 1
Peak Area [counts]	355355	403932	409311	436808	417605	430788	449962	455491	461814
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18
Peak Area IntStd [counts]	2224649	2246790	2338559	2443250	2289707	2293647	2326569	2249001	2266822
n AAValPFPTH [pmol]	1,79	2,01	1,96	2,00	2,04	2,10	2,16	2,26	2,28
Hb-Einwaage [mg]	53,2	53,2	53,2	53,2	53,2	53,2	53,2	53,2	53,2
AAValPFPTH [pmol / g Hb]	33,57	37,78	36,78	37,57	38,33	39,47	40,64	42,56	42,81
Mittelwert	36,04								
Standardabweichung	2,20								

GAVal

	Messung 1	Messung 2	+ 1µl Messung 1	+ 2µl Messung 1	+ 3µl Messung 1	+ 4µl Messung 1	+ 5µl Messung 1	+ 6µl Messung 1	+ 7µl Messung 1
Peak Area 1 [counts]	9301	18826	12395	11576	17198	24214	27995	24477	34070
Peak Area 2 [counts]	27103	35534	26169	39022	33078	62329	38930	53412	40890
Relevante Peak Area [counts]	9301	18826	12395	11576	17198	24214	27995	24477	34070
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54
IntStd Peak Area 1 [counts]	306081	288707	295744	293995	295044	278252	287323	282503	281942
IntStd Peak Area 2 [counts]	401330	398149	440518	421523	424904	416955	423237	424201	402825
Relevante Peak Area [counts]	306081	288707	295744	293995	295044	278252	287323	282503	281942
n acGAValPFPTH [pmol]	0,29	0,62	0,40	0,38	0,56	0,83	0,93	0,83	1,15
Hb-Einwaage [mg]	53,2	53,2	53,2	53,2	53,2	53,2	53,2	53,2	53,2
n acGAValPFPTH [pmol / g Hb]	5,45	11,69	7,52	7,06	10,45	15,61	17,47	15,54	21,67

Die erhaltenen Peakflächendifferenzen der dotierten Proben zur Hintergrundbelastung dienen als Grundlage für die Berechnung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen gemäß DIN-Vorschrift 32645.

Dotierung	AAVal-PFPTH		acGAVal-PFPTH	
	Zugabe [pmol]	Zuwachs [pmol/g Hb]	Zugabe [pmol]	Zuwachs [pmol/g Hb]
0	0	0	0	0
1	0,25	1,11	0,22	2,07
2	0,5	1,90	0,44	1,61
3	0,75	2,65	0,66	5
4	1	3,80	0,88	10,15
5	1,25	4,97	1,1	12,02

6	1,5	6,89	1,32	10,09
7	1,75	7,14	1,54	16,22

2.2.3. Bestimmung der Varianzen

Intraday Accuracy

AAVal-PFPTH

	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4	Messung 5	Messung 6
Peak Area [counts]	170224	160251	146602	151640	141125	141456
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18
Peak Area IntStd [counts]	1024710	975965	914479	911309	891462	869475
n AAVaIPFPTH [pmol]	1,86	1,84	1,79	1,86	1,77	1,82
Hb-Einwaage [mg]	52,12	52,12	52,12	52,12	52,12	52,12
AAValPFPTH [pmol/g Hb]	35,63	35,22	34,39	35,69	33,96	34,90

Mittelwert	34,97
Standardabweichung	0,69
Variationskoeffizient [%]	1,98

GAVal-PFPTH

	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4	Messung 5	Messung 6
Peak Area [counts]	69368	71430	0	72864	66224	60162
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54
IntStd Peak Area [counts]	414871	413555	0	396207	396118	399688
n AAVaIPFPTH [pmol]	1,60	1,65	0,00	1,75	1,59	1,44
Hb-Einwaage [mg]	52,12	52,12	52,12	52,12	52,12	52,12
acGAValPFPTH [pmol/g Hb]	30,60	31,61	0,00	33,66	30,60	27,55

Mittelwert	30,81
Standardabweichung	2,21
Variationskoeffizient [%]	7,16

Interday Accuracy

AAVal-PFPTH

	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4	Messung 5	Messung 6
Peak Area [counts]	120524	136976	138196	138506	138880	138555
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18
Peak Area IntStd [counts]	723079	721416	726649	723170	710104	708396
n AAVaIPFPTH [pmol]	1,86	2,12	2,13	2,14	2,19	2,19
Hb-Einwaage [mg]	52,12	52,12	52,12	52,12	52,12	52,12
AAValPFPTH [pmol/g Hb]	35,75	40,73	40,80	41,08	41,95	41,95

Mittelwert	40,38
Standardabweichung	2,33
Variationskoeffizient [%]	5,77
2 Tag Mittelwert	37,69
2 Tag Variationskoeffizient [%]	8,67

GAVal-PFPTH

	Messung 1	Messung 2	Messung 3	Messung 4	Messung 5	Messung 6
Peak Area [counts]	21206	19516	18113	14549	19810	22198
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54
IntStd Peak Area [counts]	302492	304775	303724	302390	291850	297274
n AAValPFPTH [pmol]	0,67	0,61	0,57	0,46	0,65	0,71
Hb-Einwaage [mg]	52,12	52,12	52,12	52,12	52,12	52,12
acGAValPFPTH [pmol/g Hb]	12,83	11,72	10,92	8,81	12,42	13,67
Mittelwert	11,73					
Standardabweichung	1,71					
Variationskoeffizient [%]	14,60					
2 Tag Mittelwert	14,51					
2 Tag Variationskoeffizient [%]	14,61					

Intraday Precision**AAVal-PFPTH**

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6
Peak Area [counts]	175348	264754	273054	258985	289682	304932
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18
Peak Area IntStd [counts]	1156944	1729926	1682775	1934281	1881925	1877477
n AAValPFPTH [pmol]	1,69	1,71	1,81	1,50	1,72	1,82
Hb-Einwaage [mg]	47,65	52,12	53,69	53,99	50,37	54,06
AAValPFPTH [pmol/g Hb]	35,56	32,83	33,79	27,73	34,17	33,59
Mittelwert	32,94					
Standardabweichung	2,71					
Variationskoeffizient [%]	8,23					

GAVal-PFPTH

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6
Peak Area [counts]	81770	148480	120222	148816	155778	155411
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54
IntStd Peak Area [counts]	787335	804430	708641	765852	804965	786059
n AAValPFPTH [pmol]	0,99	1,76	1,62	1,85	1,85	1,89
Hb-Einwaage [mg]	47,65	52,12	53,69	53,99	50,37	54,06
acGAValPFPTH [pmol/g Hb]	20,79	33,78	30,14	34,34	36,65	34,89
Mittelwert	33,96					
Standardabweichung	2,39					
Variationskoeffizient [%]	7,04					

Interday Precision**AAVal-PFPTH**

	Tag 1			Tag 2		
	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 1	Probe 2	Probe 3
Peak Area [counts]	223610	253634	426271	222508	278574	315063
V IntStd	100µl	100µl	20µl	100µl	100µl	20µl
n IntStd [pmol]	55,92	55,92	11,18	55,92	55,92	11,18
Peak Area IntStd [counts]	9106057	10606915	4102498	11036291	12947772	3176127
n AAValPFPTH [pmol]	1,37	1,34	1,16	1,13	1,20	1,11
Hb-Einwaage [mg]	45,7	52,9	45,4	45,7	52,9	45,4
AAValPFPTH [pmol/g Hb]	30,05	25,28	25,60	24,67	22,74	24,44
Mittelwert	25,46					
Standardabweichung	2,46					
Variationskoeffizient [%]	9,64					

GAVal-PFPPTH	Tag 1			Tag 2		
	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 1	Probe 2	Probe 3
Peak Area [counts]	156299	180377	192538	959311	1059233	267243
V IntStd	100µl	100µl	20µl	100µl	100µl	20µl
n IntStd [pmol]	47,70	47,70	9,54	47,70	47,70	9,54
IntStd Peak Area [counts]	3682720	3721513	1201757	19854962	20466263	1210085
n AAVaIPFPPTH [pmol]	2,02	2,31	1,53	2,30	2,47	2,11
Hb-Einwaage [mg]	45,7	52,9	45,4	45,7	52,9	45,4
acGAValPFPPTH [pmol/g Hb]	44,30	43,70	33,66	50,43	46,66	46,40
Mittelwert	44,19					
Standardabweichung	5,67					
Variationskoeffizient [%]	12,84					

2.2.4. Alternative Probenaufarbeitungen

Variante B (2 Waschschritte)

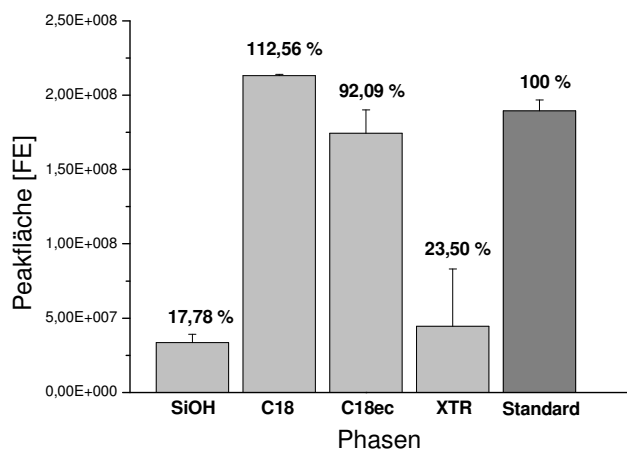
AA-Val	BW 1 1xWaschen		BW 2 1xWaschen		BW 1 2xWaschen		BW 2 2xWaschen	
	Lauf 1	Lauf 2	Lauf 1	Lauf 2	Lauf 1	Lauf 2	Lauf 1	Lauf 2
Peak Area [counts]	709018	687670	776627	772425	531748	491190	470491	717813
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18
Peak Area IntStd [counts]	3996071	4010400	3969906	3986880	3707406	3657599	3419874	3393999
n AAVaIPFPPTH [pmol]	1,98	1,92	2,19	2,17	1,60	1,50	1,54	2,36
Hb-Einwaage [mg]	52,3	52,3	52	52	52,6	52,6	53,7	53,7
AAValPFPPTH [pmol / g Hb]	37,93	36,65	42,06	41,65	30,49	28,54	28,64	44,03
	1x Waschen				2x Waschen			
Mittelwert	39,57				32,93			
Stdabw.	2,69				7,46			

GA-Val	BW 1 1xWaschen		BW 2 1xWaschen		BW 1 2xWaschen		BW 2 2xWaschen	
	Lauf 1	Lauf 2	Lauf 1	Lauf 2	Lauf 1	Lauf 2	Lauf 1	Lauf 2
Peak Area 1 [counts]	54978	30529	50064	13032	35837	33926	39356	18717
Peak Area 2 [counts]	99652	90592	140035	115012	109564	105519	71116	73157
Relevante Peak Area [counts]	99652	90592	140035	115012	109564	105519	71116	73157
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54
IntStd Peak Area 1 [counts]	828478	827096	760116	770115	755126	763826	751365	750435
IntStd Peak Area 2 [counts]	1086403	1089598	1034866	1056681	1084711	1090852	897101	895215
Relevante Peak Area [counts]	1086403	1089598	1034866	1056681	1084711	1090852	897101	895215
n acGAValPFPPTH [pmol]	0,88	0,79	1,29	1,04	0,96	0,92	0,76	0,78
Hb-Einwaage [mg]	50,4	50,4	53	53	50,7	50,7	52,5	52,5
acGAValPFPPTH [pmol / g Hb]	17,36	15,74	24,36	19,59	19,01	18,20	14,41	14,85
	1x Waschen				2x Waschen			
Mittelwert	19,26				16,62			
Stdabw.	3,75				2,33			

Variante D (SPE und Flüssig/Flüssig-Extraktion an XTR)

a) Wiederfindung an verschiedenen Adsorbermaterialien (ohne Matrix)

Phase	Fläche [FE]	Mittelwert	Stdabw.	Wiederfindung [%]
SiOH	38638469 25799666 36575689	33671274,7	5629412,79	17,7823213
C18	212032280 213893032 213493156	213139489	799753,956	112,562263
C18ec	153785468 177186085 192172176	174381243	15796311,6	92,0934332
XTR	12970604 21753535 98760400	44494846,3	38538705,3	23,498417
keine (Standard)	198098969 179700034 190258578	189352527	7538607,24	100



b) Wiederfindung an verschiedenen Adsorbermaterialien (mit Hb-Matrix)

Phase	Fläche [FE]	Mittelwert	Stdabw.	Wiederfindung [%]
keine (Standard)	232994217 234200079 229241514	232145270	2111456,84	100
XTR	65995 19371 34832	40066	19390,64	0,0173
C18	39280 34167	36723,5	2556,50	0,0158

c) Vergleich klassische Flüssig/flüssig-Extraktion mit Extraktion an der XTR-Phase (reale Proben)

Klassische Aufarbeitung (Flüssig/flüssig-Extraktion mit Diethylether)

	AAVal				GAVal			
	BW P2	BW P7	BW P9	BW P10	BW P2	BW P7	BW P9	BW P10
Peak Area [counts]	31003	48658	50126	26175	4506	8926	6814	7565
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [µmol]	9,94	9,94	9,94	9,94	9,94	9,94	9,94	9,94
IntStd Peak Area [counts]	86618	140719	169502	93954	214701	313806	370017	131158
n AA/GAValPFPTH [pmol]	3,56	3,44	2,94	2,77	0,21	0,28	0,18	0,57
Hb-Einwaage [mg]	106,1	103,8	100,4	100,8	106,1	103,8	100,4	100,8
AA/GAValPFPTH [pmol / g Hb]	33,53	33,11	29,28	27,47	1,97	2,72	1,82	5,69
Mittelwert	30,85				3,05			
Stdabw.	2,95				1,80			

XTR-Phase: Elution mit Diethylether

	AAVal				GAVal			
	BW P1	BW P5	BW P8	BW P12	BW P1	BW P5	BW P8	BW P12
Peak Area [counts]	45322	56461	34550	117120	9009	11689	9453	10201
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	9,94	9,94	9,94	9,94	9,94	9,94	9,94	9,94
Peak Area IntStd [counts]	148343	122875	161117	264647	193651	163101	208000	490180
n AA/GAValPFPTH [pmol]	3,04	4,57	2,13	4,40	0,46	0,71	0,45	0,21
Hb-Einwaage [mg]	103,5	105,3	104,8	100,1	103,5	105,3	104,8	100,1
AA/GAValPFPTH [pmol / g Hb]	29,34	43,38	20,34	43,95	4,47	6,77	4,31	2,07
Mittelwert	34,25				4,40			
Stdabw.	11,47				1,92			

XTR-Phase: Elution mit Dichlormethan

	AAVal		GAVal	
	BW P3	BW P4	BW P3	BW P4
Peak Area [counts]	29705	29785	7512	11381
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	9,94	9,94	9,94	9,94
Peak Area IntStd [counts]	147736	191456	121479	181335
n AA/GAValPFPTH [pmol]	2,00	1,55	0,61	0,62
Hb-Einwaage [mg]	104,6	103,8	104,6	103,8
AA/GAValPFPTH [pmol / g Hb]	19,11	14,90	5,88	6,01
Mittelwert	17,00		5,94	
Stdabw.	2,98		0,09	

Variante E (interne Kalibrierung mit Dipeptidstandards)

AAVal

Kalibrierung mit PFPPTH-Standard

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6
Peak Area [counts]	175348	264754	273054	258985	289682	304932
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
genaue Einwaage [mg]	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45	0,45
n IntStd [pmol]	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18
Peak Area IntStd [counts]	1156944	1729926	1682775	1934281	1881925	1877477
n AAValPFPPTH [pmol]	1,69	1,71	1,81	1,50	1,72	1,82
Hb-Einwaage [mg]	47,65	52,12	53,69	53,99	50,37	54,06
AAValPFPPTH [pmol/g Hb]	35,56	32,83	33,79	27,73	34,17	33,59
Mittelwert	32,94					
Standardabweichung	2,71					

Kalibrierung mit Dipeptidstandard

Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5
515626	348239	323323	373940	323378
20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
1,9	1,9	1,9	1,9	1,9
23,1	23,1	23,1	23,1	23,1
2203380	1850435	1275707	1846277	1625178
5,41	4,35	5,85	4,68	4,60
55,05	49,61	52,99	53,08	48,4
98,19741644	87,6286913	110,485102	88,1426554	94,9677512
95,88				
9,32				

GAVal

Kalibrierung mit PFPPTH-Standard

	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6
Peak Area 1 [counts]	51849	98030	77423	79731	84659	88148
Peak Area 2 [counts]	29921	50450	42799	69085	71119	67263
Gesamtfläche	81770	148480	120222	148816	155778	155411
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
genaue Einwaage [mg]	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43	0,43
n IntStd [pmol]	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54
IntStd Peak Area 1 [counts]	311838	328261	299601	320290	345474	329305
IntStd Peak Area 2 [counts]	475497	476169	409040	445562	459491	456754
Gesamtfläche	787335	804430	708641	765852	804965	786059
n acGAValPFPPTH [pmol]	0,99	1,76	1,62	1,85	1,85	1,89
Hb-Einwaage [mg]	47,65	52,12	53,69	53,99	50,37	54,06
acGAValPFPPTH [pmol/g Hb]	20,79	33,78	30,14	34,34	36,65	34,89
Mittelwert	33,96					
Standardabweichung	2,39					

Kalibrierung mit Dipeptidstandard

Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5
0	0	0	0	0
144007	89051	132000	261214	183577
144007	89051	132000	261214	183577
20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
1,05	1,05	1,05	1,05	1,05
47,2	47,20	47,20	47,20	47,20
0	0	0	0	0
912309	1029143	1047976	1134712	1198825
912309	1029143	1047976	1134712	1198825
7,45	4,08	5,95	10,87	7,23
49,14	47,12	46,99	51,1	49
151,62	86,68	126,52	212,63	147,51
128,08				
29,71				

3. Bestimmung der Addukte von Acrylamid und Glycidamid mit dem N-terminalen Valin des Hämoglobin

3.1. Dosimetrie mittels LC/MS/MS

3.1.1.AAVal

30 µM AA

6 h												
EdVBAA30µM6h-A21	Messung 1				Messung 2				Messung 3			
	BW	P1	P2	P3	BW	P1	P2	P3	BW	P1	P2	P3
Peak Area [counts]	831				849				3680	933		
Peak Area - BW [counts]												
c IntStd		25µg/10ml	25µg/10ml	25µg/10ml		25µg/10ml	25µg/10ml	25µg/10ml		25µg/10ml	25µg/10ml	25µg/10ml
V IntStd		20µl	20µl	20µl		20µl	20µl	20µl		20µl	20µl	20µl
m IntStd [µg]		0,05	0,05	0,05		0,05	0,05	0,05		0,05	0,05	0,05
n IntStd [µmol]		0,00012427	0,00012427	0,00012427		0,00012427	0,00012427	0,00012427		0,00012427	0,00012427	0,00012427
n IntStd [pmol]		124,270223	124,270223	124,270223		124,270223	124,270223	124,270223		124,270223	124,270223	124,270223
PA [counts] IntStd		8890	6440	3390		3120	3230	3670		2160	2440	2330
n AAVal-PFPfTH [pmol]		32,56	63,27	71,45		105,19	128,93	95,86		79,80	92,03	101,71
Hb-Einwaage [mg]		183,5	171,7	160,2		183,5	171,7	160,2		183,5	171,7	160,2
AAValPFPfTH [pmol/gHb]		177,42	368,51	445,98		573,25	750,88	598,38		434,86	536,00	634,89
Mittelwert		502,2										
Std-Abw		168,1										

24 h												
EdVBAA30µM24h-A16	Messung 1				Messung 2				Messung 3			
	BW	P1	P2	P3	BW	P1	P2	P3	BW	P1	P2	P3
Peak Area [counts]	2380				2430				6580	942		
Peak Area - BW [counts]												
c IntStd		25µg/10ml	25µg/10ml	25µg/10ml		25µg/10ml	25µg/10ml	25µg/10ml		25µg/10ml	25µg/10ml	25µg/10ml
V IntStd		20µl	20µl	20µl		20µl	20µl	20µl		20µl	20µl	20µl
m IntStd [µg]		0,05	0,05	0,05		0,05	0,05	0,05		0,05	0,05	0,05
n IntStd [µmol]		0,00012427	0,00012427	0,00012427		0,00012427	0,00012427	0,00012427		0,00012427	0,00012427	0,00012427
n IntStd [pmol]		124,270223	124,270223	124,270223		124,270223	124,270223	124,270223		124,270223	124,270223	124,270223
PA [counts] IntStd		5940	5450	5380		5780	4760	5570		2020	2550	1790
n AAVal-PFPfTH [pmol]		131,38	172,84	145,52		118,25	131,06	92,59		129,07	86,16	131,77
Hb-Einwaage [mg]		164,7	165,4	184,4		164,7	165,4	184,4		164,7	165,4	184,4
AAValPFPfTH [pmol/gHb]		797,71	1044,97	789,16		717,97	792,37	502,11		783,66	520,92	714,58
Mittelwert		740,4										
Std-Abw		161,7										

72 h												
EdVBAA30µM3d-A14	Messung 1				Messung 2				Messung 3			
	BW	P1	P2	P3	BW	P1	P2	P3	BW	P1	P2	P3
Peak Area [counts]	1800				659				2180			
Peak Area - BW [counts]												
c IntStd		25µg/10ml	25µg/10ml	25µg/10ml		25µg/10ml	25µg/10ml	25µg/10ml		25µg/10ml	25µg/10ml	25µg/10ml
V IntStd		20µl	20µl	20µl		20µl	20µl	20µl		20µl	20µl	20µl
m IntStd [µg]		0,05	0,05	0,05		0,05	0,05	0,05		0,05	0,05	0,05
n IntStd [µmol]		0,00012427	0,00012427	0,00012427		0,00012427	0,00012427	0,00012427		0,00012427	0,00012427	0,00012427
n IntStd [pmol]		124,270223	124,270223	124,270223		124,270223	124,270223	124,270223		124,270223	124,270223	124,270223
PA [counts] IntStd		5410	6040	5990		3340	4170	3790		1670	2470	2910
n AAVal-PFPfTH [pmol]		241,19	257,18	248,96		328,20	314,13	407,93		350,49	264,14	190,89
Hb-Einwaage [mg]		149,6	150,9	153,2		149,6	150,9	153,2		149,6	150,9	153,2
AAValPFPfTH [pmol/gHb]		1612,23	1704,32	1625,04		2193,85	2081,73	2662,71		2342,83	1750,41	1246,01
Mittelwert		1913,2										
Std-Abw		394,6										

300 µM AA

6 h

	Messung 1				Messung 2				Messung 3			
	BW	P1	P2	P3	BW	P1	P2	P3	BW	P1	P2	P3
EdVBAA300µM6h-A20												
Peak Area [counts]		8900	12400	10100		10100	11600	11700		4620	5250	5670
Peak Area - BW [counts]	0	8900	12400	10100		10100	11600	11700		4620	5250	5670
c IntStd		25µg/10ml	25µg/10ml	25µg/10ml		25µg/10ml	25µg/10ml	25µg/10ml		25µg/10ml	25µg/10ml	25µg/10ml
V IntStd		100µl	100µl	100µl		100µl	100µl	100µl		100µl	100µl	100µl
m IntStd [µg]		0,25	0,25	0,25		0,25	0,25	0,25		0,25	0,25	0,25
n IntStd [µmol]		0,00062135	0,00062135	0,00062135		0,00062135	0,00062135	0,00062135		0,00062135	0,00062135	0,00062135
n IntStd [pmol]		621,351116	621,351116	621,351116		621,351116	621,351116	621,351116		621,351116	621,351116	621,351116
PA [counts] IntStd		6790	6030	6400		7140	7140	7590		3770	3510	4120
n AAVal-PFPPTH [pmol]		814,44	1277,74	980,57		878,94	1009,48	957,81		761,44	929,37	855,11
Hb-Einwaage [mg]		161,3	177,4	185		161,3	177,4	185		161,3	177,4	185
AAValPFPPTH [pmol/gHb]		5049,20	7202,58	5300,38		5449,11	5690,41	5177,37		4720,67	5238,85	4622,23
Mittelwert		5383,4										
Std-Abw		759,0										

24 h

	Messung 1				Messung 2				Messung 3			
	BW	P1	P2	P3	BW	P1	P2	P3	BW	P1	P2	P3
EdVBAA300µM24h-A15												
Peak Area [counts]	1650	25600	24800	22800	2180	18800	18900	19700	499	8770	8720	8850
Peak Area - BW [counts]		23950	23150	21150		16620	16720	17520		8271	8221	8351
c IntStd		25µg/10ml	25µg/10ml	25µg/10ml		25µg/10ml	25µg/10ml	25µg/10ml		25µg/10ml	25µg/10ml	25µg/10ml
V IntStd		100µl	100µl	100µl		100µl	100µl	100µl		100µl	100µl	100µl
m IntStd [µg]		0,25	0,25	0,25		0,25	0,25	0,25		0,25	0,25	0,25
n IntStd [µmol]		0,00062135	0,00062135	0,00062135		0,00062135	0,00062135	0,00062135		0,00062135	0,00062135	0,00062135
n IntStd [pmol]		621,351116	621,351116	621,351116		621,351116	621,351116	621,351116		621,351116	621,351116	621,351116
PA [counts] IntStd		9470	8800	9240		6160	6520	6110		2660	2760	3080
n AAVal-PFPPTH [pmol]		1571,42	1634,58	1422,25		1676,44	1593,40	1781,68		1932,03	1850,77	1684,71
Hb-Einwaage [mg]		176,5	180,2	170,9		176,5	180,2	170,9		176,5	180,2	170,9
AAValPFPPTH [pmol/gHb]		8903,24	9070,91	8322,11		9498,23	8842,42	10425,28		10946,34	10270,65	9857,86
Mittelwert		9570,8										
Std-Abw		864,9										

72 h

	(Messung 1)				Messung 2				Messung 3			
	BW	P1	P2	P3	BW	P1	P2	P3	BW	P1	P2	P3
EdVBAA300µM3d-A13												
Peak Area [counts]	2240	31100	33800	27600	956	37500	36700	28500	588	23900	25000	22100
Peak Area - BW [counts]		28860	31560	25360		36544	35744	27544		23312	24412	21512
c IntStd		25µg/10ml	25µg/10ml	25µg/10ml		25µg/10ml	25µg/10ml	25µg/10ml		25µg/10ml	25µg/10ml	25µg/10ml
V IntStd		100µl	100µl	100µl		100µl	100µl	100µl		100µl	100µl	100µl
m IntStd [µg]		0,25	0,25	0,25		0,25	0,25	0,25		0,25	0,25	0,25
n IntStd [µmol]		0,00062135	0,00062135	0,00062135		0,00062135	0,00062135	0,00062135		0,00062135	0,00062135	0,00062135
n IntStd [pmol]		621,351116	621,351116	621,351116		621,351116	621,351116	621,351116		621,351116	621,351116	621,351116
PA [counts] IntStd		6350	6860	16300		5370	4750	3570		3230	3240	3140
n AAVal-PFPPTH [pmol]		2823,97	2858,58	966,72		4228,43	4675,70	4793,98		4484,50	4681,61	4256,85
Hb-Einwaage [mg]		164,5	166,8	164,1		164,5	166,8	164,1		164,5	166,8	164,1
AAValPFPPTH [pmol/gHb]		17166,98	17137,75	5891,02		25704,73	28031,77	29213,75		27261,40	28067,22	25940,58
Mittelwert						27369,9						
Std-Abw						1352,9						

3 mM AA

6 h

EdVBAA3mM6h-A19	Messung 1				Messung 2				Messung 3			
	BW	P1	P2	P3	BW	P1	P2	P3	BW	P1	P2	P3
Peak Area [counts]	0	174000	56000	163000	469	190000	63400	177000	0	84200	35800	102000
Peak Area - BW [counts]		174000	56000	163000		189531	62931	176531		84200	35800	102000
c IntStd		2,5mg/10ml	2,5mg/10ml	2,5mg/10ml		2,5mg/10ml	2,5mg/10ml	2,5mg/10ml		2,5mg/10ml	2,5mg/10ml	2,5mg/10ml
V IntStd		20µl	20µl	20µl		20µl	20µl	20µl		20µl	20µl	20µl
m IntStd [µg]		5	5	5		5	5	5		5	5	5
n IntStd [µmol]		0,01242702	0,01242702	0,01242702		0,01242702	0,01242702	0,01242702		0,01242702	0,01242702	0,01242702
n IntStd [pmol]		12427,0223	12427,0223	12427,0223		12427,0223	12427,0223	12427,0223		12427,0223	12427,0223	12427,0223
PA [counts] IntStd		161000	153000	158000		179000	178000	176000		85000	104000	102000
n AAVal-PFPPTH [pmol]		13430,45	4548,45	12820,28		13158,13	4393,51	12464,52		12310,06	4277,76	12427,02
Hb-Einwaage [mg]		172,3	177	165,5		172,3	177	165,5		172,3	177	165,5
AAValPFPPTH [pmol/gHb]		77948,04	25697,47	77463,94		76367,58	24822,10	75314,29		71445,51	24168,16	75087,75
Mittelwert		58701,6										
Std-Abw		25424,1										

24 h

EdVBAA3mM24h-A11	Messung 1				Messung 2				Messung 3			
	BW	P1	P2	P3	BW	P1	P2	P3	BW	P1	P2	P3
Peak Area [counts]	2850	458000	538000	523000	616	587000	616000	661000	458	331000	368000	355000
Peak Area - BW [counts]		455150	535150	520150		586384	615384	660384		330542	367542	354542
c IntStd		2,5mg/10ml	2,5mg/10ml	2,5mg/10ml		2,5mg/10ml	2,5mg/10ml	2,5mg/10ml		2,5mg/10ml	2,5mg/10ml	2,5mg/10ml
V IntStd		20µl	20µl	20µl		20µl	20µl	20µl		20µl	20µl	20µl
m IntStd [µg]		5	5	5		5	5	5		5	5	5
n IntStd [µmol]		0,01242702	0,01242702	0,01242702		0,01242702	0,01242702	0,01242702		0,01242702	0,01242702	0,01242702
n IntStd [pmol]		12427,0223	12427,0223	12427,0223		12427,0223	12427,0223	12427,0223		12427,0223	12427,0223	12427,0223
PA [counts] IntStd		104000	123000	103000		137000	145000	146000		79900	87000	78900
n AAVal-PFPPTH [pmol]		54386,15	54067,65	62756,46		53189,83	52740,63	56209,63		51409,92	52499,46	55841,59
Hb-Einwaage [mg]		172,5	170,2	181		172,5	170,2	181		172,5	170,2	181
AAValPFPPTH [pmol/gHb]		315282,01	317671,27	346720,79		308346,86	309874,42	310550,47		298028,54	308457,44	308517,06
Mittelwert		313716,5										
Std-Abw		13517,6										

72 h

EdVBAA3mM3d-A9	Messung 1				Messung 2				Messung 3			
	BW	P1	P2	P3	BW	P1	P2	P3	BW	P1	P2	P3
Peak Area [counts]	964	719000	734000	677000	776	852000	975000	765000	714	649000	665000	532000
Peak Area - BW [counts]		718036	733036	676036		851224	974224	764224		648286	664286	531286
c IntStd		2,5mg/10ml	2,5mg/10ml	2,5mg/10ml		2,5mg/10ml	2,5mg/10ml	2,5mg/10ml		2,5mg/10ml	2,5mg/10ml	2,5mg/10ml
V IntStd		100µl	100µl	100µl		100µl	100µl	100µl		100µl	100µl	100µl
m IntStd [µg]		25	25	25		25	25	25		25	25	25
n IntStd [µmol]		0,06213511	0,06213511	0,06213511		0,06213511	0,06213511	0,06213511		0,06213511	0,06213511	0,06213511
n IntStd [pmol]		62135,1116	62135,1116	62135,1116		62135,1116	62135,1116	62135,1116		62135,1116	62135,1116	62135,1116
PA [counts] IntStd		366000	359000	334000		446000	503000	388000		332000	343000	275000
n AAVal-PFPPTH [pmol]		121899,58	126872,63	125765,19		118589,46	120344,96	122384,39		121329,29	120336,69	120041,87
Hb-Einwaage [mg]		190,9	178,8	172,1		190,9	178,8	172,1		190,9	178,8	172,1
AAValPFPPTH [pmol]/gHb		638552,03	709578,46	730768,08		621212,46	673070,27	711123,71		635564,62	673023,99	697512,33
Mittelwert		676711,8										
Std-Abw		38528,3										

3.1.2. GAVal

30 µM GA

6 h

EdVBA30µM6h-A25	Messung 1				Messung 2				Messung 3			
	BW	P1	P2	P3	BW	P1	P2	P3	BW	P1	P2	P3
Peak Area [counts]	958	921	1140	1030	603	623	974	877	393	512	523	749
Peak Area - BW [counts]		0	182	72		20	371	274		119	130	356
c IntStd	0,25mg/10ml	0,25mg/10ml	0,25mg/10ml	0,25mg/10ml	0,25mg/10ml	0,25mg/10ml	0,25mg/10ml	0,25mg/10ml	0,25mg/10ml	0,25mg/10ml	0,25mg/10ml	0,25mg/10ml
V IntStd	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
m IntStd [µg]	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
n IntStd [µmol]	0,00621351	0,00621351	0,00621351	0,00621351	0,00621351	0,00621351	0,00621351	0,00621351	0,00621351	0,00621351	0,00621351	0,00621351
n IntStd [pmol]	6213,51116	6213,51116	6213,51116	6213,51116	6213,51116	6213,51116	6213,51116	6213,51116	6213,51116	6213,51116	6213,51116	6213,51116
PA [counts] IntStd	27700	28300	24600	24200	22900	19900			11800	14100	12800	
n GAValPFPTH [pmol]	0,00	39,96	18,19	5,14	100,66	85,55			62,66	57,29	172,81	
Korrekturfaktor	2,0418	2,0418	2,0418	2,0418	2,0418	2,0418			2,0418	2,0418	2,0418	
n GAValPFPTH [pmol] korr	0,00	19,57	8,91	2,52	49,30	41,90			30,69	28,06	84,64	
Hb-Einwaage [mg]	150,3	164,1	182,4	150,3	164,1	182,4			150,3	164,1	182,4	
GAValPFPTH [pmol/gHb]	0,00	119,26	48,83	16,73	300,44	229,72			204,19	170,98	464,02	
Mittelwert	194,3											
Std-Abw	143,5											

24 h

EdVGA30µM24h-A27	Messung 1				Messung 2				Messung 3			
	BW	P1	P2	P3	BW	P1	P2	P3	BW	P1	P2	P3
Peak Area [counts]	500		786	951	0	0	905	1040	1140	879	731	856
Peak Area - BW [counts]		286	451		0		905	1040	1140		-148	-23
												561
												-318
c IntStd	0,25mg/10ml		0,25mg/10ml	0,25mg/10ml		0,25mg/10ml	0,25mg/10ml	0,25mg/10ml		0,25mg/10ml	0,25mg/10ml	0,25mg/10ml
V IntStd	100µl		100µl	100µl		100µl	100µl	100µl		100µl	100µl	100µl
m IntStd [µg]	2,5		2,5	2,5		2,5	2,5	2,5		2,5	2,5	2,5
n IntStd [µmol]	0,00621351		0,00621351	0,00621351		0,00621351	0,00621351	0,00621351		0,00621351	0,00621351	0,00621351
n IntStd [pmol]	6213,51116		6213,51116	6213,51116		6213,51116	6213,51116	6213,51116		6213,51116	6213,51116	6213,51116
PA [counts] IntStd	15400		11100	0		15800	13000	11700		10200	10900	7590
n GAValPFPTH [pmol]	115,39		252,46	0,00		355,90	497,08	605,42		-90,16	-13,11	-260,33
Korrekturfaktor	2,0418		2,0418	2,0418		2,0418	2,0418	2,0418		2,0418	2,0418	2,0418
n GAValPFPTH [pmol] korr	56,52		123,65	0,00		174,31	243,45	296,51		-44,16	-6,42	-127,50
Hb-Einwaage [mg]	173,6		179,8	181,2		173,6	179,8	181,2		173,6	179,8	181,2
GAValPFPTH [pmol/gHb]	325,55		687,68	0,00		1004,07	1354,02	1636,38		-254,35	-35,71	-703,64
Mittelwert	506,6											
Std-Abw	256,1											

72 h

EdVBGA30µM3d-A29		Messung 1			Messung 2		
		BW	P1	P2	P3	BW	P1
Peak Area [counts]		636		1760	1670	1830	0
Peak Area - BW [counts]			1124	1034	1194		
c IntStd	0,25mg/10ml						
V IntStd	100µl						
m IntStd [µg]	2,5						
n IntStd [µmol]	0,00621351						
n IntStd [pmol]	6213,51116						
PA [counts] IntStd	21100						
n GAValPFPTH [pmol]	330,99						
Korrekturfaktor	2,0418						
n GAValPFPTH [pmol] korr	162,11						
Hb-Einwaage [mg]	159,5						
GAValPFPTH [pmol/gHb]	1016,36						
Mittelwert	1143,4						
Std-Abw	368,3						

300 µM GA

6 h

EdVBGA300µM6h-A32									
Messung 1					Messung 2				
Peak Area [counts]	BW	P1	P2	P3	BW	P1	P2	P3	
Peak Area - BW [counts]	0	3740	3440	4030	859	3110	3390	3300	
		3740	3440	4030		2251	2531	2441	
c IntStd		0,25mg/10ml	0,25mg/10ml	0,25mg/10ml		0,25mg/10ml	0,25mg/10ml	0,25mg/10ml	
V IntStd		100µl	100µl	100µl		100µl	100µl	100µl	
m IntStd [µg]		25	25	25		25	25	25	
n IntStd [µmol]		0,06213511	0,06213511	0,06213511		0,06213511	0,06213511	0,06213511	
n IntStd [pmol]		62135,1116	62135,1116	62135,1116		62135,1116	62135,1116	62135,1116	
PA [counts] IntStd		171000	152000	170000		140000	139000	146000	
n GAVaIPFPPTH [pmol]		1358,98	1406,22	1472,97		999,04	1131,40	1038,85	
Korrekturfaktor		2,0418	2,0418	2,0418		2,0418	2,0418	2,0418	
n GAVaIPFPPTH [pmol] korr		665,58	688,71	721,41		489,30	554,12	508,79	
Hb-Einwaage [mg]		176,2	185,4	184,9		176,2	185,4	184,9	
GAVaIPFPPTH [pmol/gHb]		3777,40	3714,75	3901,60		2776,93	2988,76	2751,71	
Mittelwert		3318,5							
Std-Abw		535,0							

24 h

EdVBGA300µM24h-A24														
Messung 1					Messung 2					Messung 3				
Peak Area [counts]	BW	P1	P2	P3	BW	P1	P2	P3		BW	P1	P2	P3	
Peak Area - BW [counts]	0	1820	1730	2680	0	1980	2870	3110		873	2720	2790	2740	
		1820	1730	2680		1980	2870	3110			1847	1917	1867	
c IntStd		25µg/10ml	25µg/10ml	25µg/10ml		25µg/10ml	25µg/10ml	25µg/10ml			25µg/10ml	25µg/10ml	25µg/10ml	
V IntStd		100µl	100µl	100µl		100µl	100µl	100µl			100µl	100µl	100µl	
m IntStd [µg]		0,25	0,25	0,25		0,25	0,25	0,25			0,25	0,25	0,25	
n IntStd [µmol]		0,00062135	0,00062135	0,00062135		0,00062135	0,00062135	0,00062135			0,00062135	0,00062135	0,00062135	
n IntStd [pmol]		621,351116	621,351116	621,351116		621,351116	621,351116	621,351116			621,351116	621,351116	621,351116	
PA [counts] IntStd		1210	1400	1790		1430	1580	1870			1900	1770	1850	
n GAVaIPFPPTH [pmol]		934,59	767,81	930,29		860,33	1128,66	1033,37			604,02	672,95	627,06	
Korrekturfaktor		2,0418	2,0418	2,0418		2,0418	2,0418	2,0418			2,0418	2,0418	2,0418	
n GAVaIPFPPTH [pmol] korr		457,73	376,05	455,62		421,36	552,78	506,11			295,83	329,59	307,11	
Hb-Einwaage [mg]		177	183,5	173,7		177	183,5	173,7			177	183,5	173,7	
GAVaIPFPPTH [pmol/gHb]		2586,05	2049,30	2623,05		2380,56	3012,40	2913,69			1671,34	1796,13	1768,06	
Mittelwert		2594,2												
Std-Abw		352,3												

72 h

EdVBGA300µM3d-A18														
Messung 1					Messung 2					Messung 3				
Peak Area [counts]	BW	P1	P2	P3	BW	P1	P2	P3		BW	P1	P2	P3	
Peak Area - BW [counts]	2190	14400	22000	14800	2220	19900	29800	20600		660	11300	19300	16800	
		12210	19810	12610		17680	27580	18380			10640	18640	16140	
c IntStd		25µg/10ml	25µg/10ml	25µg/10ml		25µg/10ml	25µg/10ml	25µg/10ml			25µg/10ml	25µg/10ml	25µg/10ml	
V IntStd		100µl	100µl	100µl		100µl	100µl	100µl			100µl	100µl	100µl	
m IntStd [µg]		0,25	0,25	0,25		0,25	0,25	0,25			0,25	0,25	0,25	
n IntStd [µmol]		0,00062135	0,00062135	0,00062135		0,00062135	0,00062135	0,00062135			0,00062135	0,00062135	0,00062135	
n IntStd [pmol]		621,351116	621,351116	621,351116		621,351116	621,351116	621,351116			621,351116	621,351116	621,351116	
PA [counts] IntStd		3970	4500	2330		3550	5230	2050			1890	3120	2340	
n GAVaIPFPPTH [pmol]		1911,01	2735,33	3362,76		3094,50	3276,65	5570,94			3497,98	3712,17	4285,73	
Korrekturfaktor		2,0418	2,0418	2,0418		2,0418	2,0418	2,0418			2,0418	2,0418	2,0418	
n GAVaIPFPPTH [pmol] korr		935,94	1339,66	1646,96		1515,58	1604,78	2728,45			1713,18	1818,09	2099,00	
Hb-Einwaage [mg]		167,1	170,3	169		167,1	170,3	169			167,1	170,3	169	
GAVaIPFPPTH [pmol/gHb]		5601,09	7866,49	9745,33		9069,88	9423,27	16144,66			10252,44	10675,80	12420,09	
Mittelwert		10133,2												
Std-Abw		2939,8												

3 mM GA

6 h

EdVBGA3mM6h-A31	Messung 1				Messung 2			
	BW	P1	P2	P3	BW	P1	P2	P3
Peak Area [counts]	1130	34900	24100	33300	564	31500	22300	29500
Peak Area - BW [counts]		33770	22970	32170		30936	21736	28936
c IntStd		2,5mg/10ml	2,5mg/10ml	2,5mg/10ml		2,5mg/10ml	2,5mg/10ml	2,5mg/10ml
V IntStd		100µl	100µl	100µl		100µl	100µl	100µl
m IntStd [µg]		25	25	25		25	25	25
n IntStd [µmol]		0,06213511	0,06213511	0,06213511		0,06213511	0,06213511	0,06213511
n IntStd [pmol]		62135,1116	62135,1116	62135,1116		62135,1116	62135,1116	62135,1116
PA [counts] IntStd		186000	150000	152000		159000	127000	141000
n GAVaIPFPTH [pmol]		11281,20	9514,96	13150,57		12089,38	10634,40	12751,36
Korrekturfaktor		2,0418	2,0418	2,0418		2,0418	2,0418	2,0418
n GAVaIPFPTH [pmol] korr		5525,12	4660,08	6440,67		5920,94	5208,35	6245,16
Hb-Einwaage [mg]		169,9	154,1	168,5		169,9	154,1	168,5
GAVaIPFPTH [pmol/gHb]		32519,86	30240,64	38223,59		34849,58	33798,48	37063,24
Mittelwert		34449,2						
Std-Abw		2935,9						

24 h

EdVBGA3mM24h-A23	Messung 1				Messung 2			
	BW	P1	P2	P3	BW	P1	P2	P3
Peak Area [counts]	1390	52300	39200	33200	1680	62100	67500	52400
Peak Area - BW [counts]		50910	37810	31810		60420	65820	50720
c IntStd		2,5mg/10ml	2,5mg/10ml	2,5mg/10ml		2,5mg/10ml	2,5mg/10ml	2,5mg/10ml
V IntStd		20µl	20µl	20µl		20µl	20µl	20µl
m IntStd [µg]		5	5	5		5	5	5
n IntStd [µmol]		0,01242702	0,01242702	0,01242702		0,01242702	0,01242702	0,01242702
n IntStd [pmol]		12427,0223	12427,0223	12427,0223		12427,0223	12427,0223	12427,0223
PA [counts] IntStd		69200	49400	36600		83100	86100	58000
n GAVaIPFPTH [pmol]		9142,48	9511,45	10800,64		9035,39	9499,96	10867,22
Korrekturfaktor		2,0418	2,0418	2,0418		2,0418	2,0418	2,0418
n GAVaIPFPTH [pmol] korr		4477,66	4658,37	5289,77		4425,21	4652,74	5322,74
Hb-Einwaage [mg]		156,1	159,1	174,8		156,1	159,1	174,8
GAVaIPFPTH [pmol/gHb]		28684,55	29279,48	30261,82		28348,54	29244,11	30448,35
Mittelwert		29377,8						
Std-Abw		836,1						

72 h

EdVBGA3mM3d-A17	Messung 1				Messung 2			
	BW	P1	P2	P3	BW	P1	P2	P3
Peak Area [counts]	2160	755000	576000	682000	987	966000	779000	865000
Peak Area - BW [counts]		752840	573840	679840		965013	778013	864013
c IntStd		2,5mg/10ml	2,5mg/10ml	2,5mg/10ml		2,5mg/10ml	2,5mg/10ml	2,5mg/10ml
V IntStd		20µl	20µl	20µl		20µl	20µl	20µl
m IntStd [µg]		5	5	5		5	5	5
n IntStd [mol]		0,01242702	0,01242702	0,01242702		0,01242702	0,01242702	0,01242702
n IntStd [nmol]		12427,0223	12427,0223	12427,0223		12427,0223	12427,0223	12427,0223
PA [counts] IntStd		121000	103000	111000		124000	114000	119000
n GAVaIPFPTH [pmol]		77318,67	69234,20	76111,59		96711,60	84810,39	90227,81
Korrekturfaktor		2,0418	2,0418	2,0418		2,0418	2,0418	2,0418
n GAVaIPFPTH [pmol] korr		37867,90	33908,41	37276,71		47365,85	41537,07	44190,32
Hb-Einwaage [mg]		188,5	160,9	164,4		188,5	160,9	164,4
GAVaIPFPTH [pmol/gHb]		200890,70	210742,16	226744,00		251277,73	258154,58	268797,60
Mittelwert		236101,1						
Std-Abw		27408,6						

3.2. Hintergrundbelastungen von AAVal/GAVal mittels GC/MS

3.2.1. Nichtraucher

Spende 1

AAVal [pmol/g Hb]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	GAVal [pmol/g Hb]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
Peak Area [counts]	2222721	2155730	1288561	2314733	Peak Area [counts]	154814	180155	129041	206618
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	9,94	9,94	9,94	9,94	n IntStd [pmol]	9,7	9,7	9,7	9,7
Peak Area IntStd [counts]	13688830	12418578	5553843	11335379	Peak Area IntStd [counts]	3767954	4246001	2297835	4498526
n AAValPFPTH [pmol]	1,61	1,73	2,31	2,03	n acGAValPFPTH [pmol]	0,40	0,41	0,54	0,45
Hb-Einwaage [mg]	49,4	50,3	52,4	52,1	Hb-Einwaage [mg]	49,4	50,3	52,4	52,1
AAValPFPTH [pmol/g Hb]	32,67	34,30	44,01	38,96	acGAValPFPTH [pmol/g Hb]	8,07	8,18	10,40	8,55
Mittelwert	37,49				Mittelwert	8,80			
Standardabweichung	5,10				Standardabweichung	1,08			

Spende 2

AAVal [pmol/g Hb]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	GAVal [pmol/g Hb]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
Peak Area [counts]	175348	264754	273054	258985	Peak Area [counts]	81770	148480	120222	148816
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	9,98	9,98	9,98	9,98	n IntStd [pmol]	8,86	8,86	8,86	8,86
Peak Area IntStd [counts]	1156944	1729926	1682775	1934281	Peak Area IntStd [counts]	787335	804430	708641	765852
n AAValPFPTH [pmol]	1,51	1,53	1,62	1,34	n GAValPFPTH [pmol]	0,92	1,64	1,50	1,72
Hb-Einwaage [mg]	47,65	52,12	53,69	53,99	Hb-Einwaage [mg]	47,65	52,12	53,69	53,99
AAValPFPTH [pmol/g Hb]	31,74	29,30	30,16	24,75	GAValPFPTH [pmol/g Hb]	19,31	31,38	28,00	31,89
Mittelwert	28,99				Mittelwert	27,64			
Standardabweichung	3,00				Standardabweichung	5,82			

Spende 3

AAVal [pmol/g Hb]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	GAVal [pmol/g Hb]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
Peak Area [counts]	2231932	2358221	2532052	2145818	Peak Area [counts]	837751	918892	810682	731267
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	9,98	9,98	9,98	9,98	n IntStd [pmol]	9,7	9,7	9,7	9,7
Peak Area IntStd [counts]	12671122	12365846	11751303	11568496	Peak Area IntStd [counts]	4376696	4182310	4112503	4002865
n AAValPFPTH [pmol]	1,76	1,90	2,15	1,85	n acGAValPFPTH [pmol]	1,86	2,13	1,91	1,77
Hb-Einwaage [mg]	48,3	50,4	52,1	47,7	Hb-Einwaage [mg]	48,3	50,4	52,1	47,7
AAValPFPTH [pmol/g Hb]	36,40	37,76	41,27	38,81	acGAValPFPTH [pmol/g Hb]	38,44	42,29	36,70	37,15
Mittelwert	38,56				Mittelwert	38,64			
Standardabweichung	2,06				Standardabweichung	2,54			

Spende 4

AAVal [pmol/g Hb]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	GAVal [pmol/g Hb]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
Peak Area [counts]	2935847	3228712	3347247	3283811	Peak Area [counts]	847196	905525	1396906	952613
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	9,98	9,98	9,98	9,98	n IntStd [pmol]	9,7	9,7	9,7	9,7
Peak Area IntStd [counts]	16242270	13877790	16101226	14644188	Peak Area IntStd [counts]	5322993	5285374	5383688	5373713
n AAValPFPTH [pmol]	1,80	2,32	2,07	2,24	n acGAValPFPTH [pmol]	1,54	1,66	2,52	1,72
Hb-Einwaage [mg]	45,6	54,9	54	48,6	Hb-Einwaage [mg]	45,6	54,9	54	48,6
AAValPFPTH [pmol/g Hb]	39,56	42,29	38,42	46,05	acGAValPFPTH [pmol/g Hb]	33,86	30,27	46,61	35,38
Mittelwert	41,58				Mittelwert	36,53			
Standardabweichung	3,39				Standardabweichung	7,05			

Spende 5

AAVal [pmol/g Hb]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	GAVal [pmol/g Hb]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
Peak Area [counts]	1550609	1720456	1781402	1712599	Peak Area [counts]	99433	74063	99698	0
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	9,98	9,98	9,98	9,98	n IntStd [pmol]	9,7	9,7	9,7	9,7
Peak Area IntStd [counts]	11041415	12241306	12710727	11141081	Peak Area IntStd [counts]	3271228	3738817	3429879	0
n AAValPFPTH [pmol]	1,40	1,40	1,40	1,53	n GAValPFPTH [pmol]	0,29	0,19	0,28	0,00
Hb-Einwaage [mg]	46,5	47	46,3	47,6	Hb-Einwaage [mg]	46,5	47	46,3	47,6
AAValPFPTH [pmol/g Hb]	30,14	29,84	30,21	32,23	GAValPFPTH [pmol/g Hb]	6,34	4,09	6,09	0,00
Mittelwert	30,61				Mittelwert	5,51			
Standardabweichung	1,09				Standardabweichung	1,23			

Spende 6

AAVal [pmol/g Hb]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	GAVal [pmol/g Hb]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
Peak Area [counts]	2282545	2327571	2240359	2119974	Peak Area [counts]	238249	220353	157608	159685
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	9,98	9,98	9,98	9,98	n IntStd [pmol]	9,98	9,98	9,98	9,98
Peak Area IntStd [counts]	10957262	10910069	11220418	11668653	Peak Area IntStd [counts]	5059676	4037597	4539927	4470800
n AAValPFPTH [pmol]	2,08	2,13	1,99	1,81	n GAValPFPTH [pmol]	0,47	0,54	0,35	0,36
Hb-Einwaage [mg]	49,6	49,2	49,5	47,4	Hb-Einwaage [mg]	49,6	49,2	49,5	47,4
AAValPFPTH [pmol/g Hb]	41,91	43,28	40,26	38,25	GAValPFPTH [pmol/g Hb]	9,47	11,07	7,00	7,52
Mittelwert	40,92				Mittelwert	8,77			
Standardabweichung	2,17				Standardabweichung	1,87			

Spender 7

AAVal [pmol/g Hb]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	GAVal [pmol/g Hb]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
Peak Area [counts]	331465	489112	460588	402175	Peak Area [counts]	611170	103768	89178	78962
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	9,98	9,98	9,98	9,98	n IntStd [pmol]	9,7	9,7	9,7	9,7
Peak Area IntStd [counts]	2256119	2786657	2312713	2650065	Peak Area IntStd [counts]	1252659	1277176	1188274	1386079
n AAVaIPFPPTH [pmol]	1,47	1,75	1,99	1,51	n GAValPFPPTH [pmol]	0,47	0,79	0,73	0,55
Hb-Einwaage [mg]	49,3	50,2	50,9	51,6	Hb-Einwaage [mg]	49,3	50,2	50,9	51,6
AAValPFPPTH [pmol/g Hb]	29,74	34,89	39,05	29,35	GAValPFPPTH [pmol/g Hb]	9,61	15,70	14,30	10,71
Mittelwert	33,26				Mittelwert	12,58			
Standardabweichung	4,61				Standardabweichung	2,89			

Spender 8

AAVal [pmol/g Hb]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	GAVal [pmol/g Hb]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
Peak Area [counts]	632978	340363	556318	441291	Peak Area [counts]	43992	96782	81618	64565
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	9,98	9,98	9,98	9,98	n IntStd [pmol]	9,7	9,7	9,7	9,7
Peak Area IntStd [counts]	3178670	2732958	3072856	2873057	Peak Area IntStd [counts]	1834560	1651894	1386189	1087110
n AAVaIPFPPTH [pmol]	1,99	1,24	1,81	1,53	n GAValPFPPTH [pmol]	0,23	0,57	0,57	0,58
Hb-Einwaage [mg]	54,9	47,2	51,3	52,5	Hb-Einwaage [mg]	54,9	47,2	51,3	52,5
AAValPFPPTH [pmol/g Hb]	36,20	26,33	35,22	29,20	GAValPFPPTH [pmol/g Hb]	4,24	12,04	11,13	10,97
Mittelwert	31,74				Mittelwert	9,60			
Standardabweichung	4,75				Standardabweichung	3,60			

Spender 9

AAVal [pmol/g Hb]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	GAVal [pmol/g Hb]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
Peak Area [counts]	523238	522783	439244	459798	Peak Area [counts]	36369	57204	44244	52155
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	9,98	9,98	9,98	9,98	n IntStd [pmol]	9,7	9,7	9,7	9,7
Peak Area IntStd [counts]	2611521	2341923	2379395	2552389	Peak Area IntStd [counts]	1535216	1423958	1409668	1455563
n AAVaIPFPPTH [pmol]	2,00	2,23	1,84	1,80	n GAValPFPPTH [pmol]	0,23	0,39	0,30	0,35
Hb-Einwaage [mg]	48,6	52,9	48,8	48,3	Hb-Einwaage [mg]	48,6	52,9	48,8	48,3
AAValPFPPTH [pmol/g Hb]	41,14	42,11	37,75	37,22	GAValPFPPTH [pmol/g Hb]	4,73	7,37	6,24	7,20
Mittelwert	39,56				Mittelwert	6,38			
Standardabweichung	2,43				Standardabweichung	1,21			

Spender 10

AAVal [pmol/g Hb]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	GAVal [pmol/g Hb]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
Peak Area [counts]	585825	542992	503433	572648	Peak Area [counts]	78369	92444	91950	87254
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	9,94	9,94	9,94	9,94	n IntStd [pmol]	9,56	9,56	9,56	9,56
Peak Area IntStd [counts]	3042696	2498082	2546814	2717144	Peak Area IntStd [counts]	573450	537845	542726	504338
n AAVaIPFPPTH [pmol]	1,91	2,16	1,96	2,09	n GAValPFPPTH [pmol]	1,31	1,64	1,62	1,65
Hb-Einwaage [mg]	49,6	51,6	49,2	48,6	Hb-Einwaage [mg]	49,6	51,6	49,2	48,6
AAValPFPPTH [pmol/g Hb]	38,58	41,87	39,94	43,10	GAValPFPPTH [pmol/g Hb]	26,34	31,84	32,92	34,03
Mittelwert	40,87				Mittelwert	31,28			
Standardabweichung	2,01				Standardabweichung	3,41			

Spender 11

AAVal [pmol/g Hb]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	GAVal [pmol/g Hb]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
Peak Area [counts]	826475	659727	558677	682914	Peak Area [counts]	136581	140752	137064	65369
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	9,98	9,98	9,98	9,98	n IntStd [pmol]	9,7	9,7	9,7	9,7
Peak Area IntStd [counts]	2865714	2433285	2345633	2191672	Peak Area IntStd [counts]	499261	556690	639876	263840
n AAVaIPFPPTH [pmol]	2,88	2,71	2,38	3,11	n GAValPFPPTH [pmol]	2,65	2,45	2,08	2,40
Hb-Einwaage [mg]	56,5	48,4	52,3	52,2	Hb-Einwaage [mg]	56,5	48,4	52,3	52,2
AAValPFPPTH [pmol/g Hb]	50,94	55,91	45,45	59,57	GAValPFPPTH [pmol/g Hb]	46,97	50,67	39,73	46,04
Mittelwert	52,97				Mittelwert	45,85			
Standardabweichung	6,13				Standardabweichung	4,55			

Spender 12

AAVal [pmol/g Hb]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	GAVal [pmol/g Hb]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
Peak Area [counts]	102356	105534	114029	167636	Peak Area [counts]	25803	30170	19724	44183
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	9,98	9,98	9,98	9,98	n IntStd [pmol]	9,7	9,7	9,7	9,7
Peak Area IntStd [counts]	656744	730870	625508	1052954	Peak Area IntStd [counts]	342100	366732	195291	322507
n AAVaIPFPPTH [pmol]	1,56	1,44	1,82	1,59	n GAValPFPPTH [pmol]	0,73	0,80	0,98	1,33
Hb-Einwaage [mg]	46,3	47,1	53,5	47,5	Hb-Einwaage [mg]	46,3	47,1	53,5	47,5
AAValPFPPTH [pmol/g Hb]	33,59	30,60	34,01	33,45	GAValPFPPTH [pmol/g Hb]	15,80	16,94	18,31	27,98
Mittelwert	32,91				Mittelwert	19,76			
Standardabweichung	1,56				Standardabweichung	5,57			

Spender 13

AAVal [pmol/g Hb]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	GAVal [pmol/g Hb]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
Peak Area [counts]	14691	20060	20636	24649	Peak Area [counts]	0	8825	24324	17628
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	9,98	9,98	9,98	9,98	n IntStd [pmol]	8,86	8,86	8,86	8,86
Peak Area IntStd [counts]	135427	124931	210479	200014	Peak Area IntStd [counts]	0	287639	295240	249470
n AAVaIPFPPTH [pmol]	1,08	1,60	0,98	1,23	n GAValPFPPTH [pmol]	0,00	0,27	0,73	0,63
Hb-Einwaage [mg]	49,7	53,9	55,8	52,3	Hb-Einwaage [mg]	49,7	53,9	55,8	52,3
AAValPFPPTH [pmol/g Hb]	21,78	29,73	17,54	23,52	GAValPFPPTH [pmol/g Hb]	0,00	5,04	13,08	11,97
Mittelwert	23,14				Mittelwert	10,03			
Standardabweichung	5,06				Standardabweichung	4,36			

Spender 14

AAVal [pmol/g Hb]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	GAVal [pmol/g Hb]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
Peak Area [counts]	645556	819688	735074	807605	Peak Area [counts]	77286	80977	77652	95297
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	9,94	9,94	9,94	9,94	n IntStd [pmol]	9,56	9,56	9,56	9,56
Peak Area IntStd [counts]	2459687	3019248	2755340	3028745	Peak Area IntStd [counts]	543714	561984	524590	627194
n AAVaIPFPPTH [pmol]	2,61	2,70	2,65	2,65	n GAValPFPPTH [pmol]	1,36	1,38	1,42	1,45
Hb-Einwaage [mg]	50,4	50,9	49,3	49,8	Hb-Einwaage [mg]	50,4	50,9	49,3	49,8
AAValPFPPTH [pmol/g Hb]	51,76	53,02	53,79	53,22	GAValPFPPTH [pmol/g Hb]	26,96	27,06	28,70	29,17
Mittelwert	52,95				Mittelwert	27,97			
Standardabweichung	0,86				Standardabweichung	1,13			

Spender 15

AAVal [pmol/g Hb]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	GAVal [pmol/g Hb]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
Peak Area [counts]	945002	834855	777949	974522	Peak Area [counts]	90291	62458	72581	47881
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	9,94	9,94	9,94	9,94	n IntStd [pmol]	9,56	9,56	9,56	9,56
Peak Area IntStd [counts]	5207475	5210964	4703996	5544456	Peak Area IntStd [counts]	896428	786043	727705	935459
n AAVaIPFPPTH [pmol]	1,80	1,59	1,64	1,75	n GAValPFPPTH [pmol]	0,96	0,76	0,95	0,49
Hb-Einwaage [mg]	51	48,8	50,7	49,8	Hb-Einwaage [mg]	51	48,8	50,7	49,8
AAValPFPPTH [pmol/g Hb]	35,37	32,63	32,42	35,08	GAValPFPPTH [pmol/g Hb]	18,88	15,57	18,81	9,83
Mittelwert	33,88				Mittelwert	15,77			
Standardabweichung	1,56				Standardabweichung	4,25			

Spender 16

AAVal [pmol/g Hb]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	GAVal [pmol/g Hb]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
Peak Area [counts]	986819	1130505	1066517	1094662	Peak Area [counts]	47565	97170	29876	54624
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	9,94	9,94	9,94	9,94	n IntStd [pmol]	9,56	9,56	9,56	9,56
Peak Area IntStd [counts]	5010674	5484726	5219177	5736462	Peak Area IntStd [counts]	881540	854867	896608	891289
n AAVaIPFPPTH [pmol]	1,96	2,05	2,03	1,90	n GAValPFPPTH [pmol]	0,52	1,09	0,32	0,59
Hb-Einwaage [mg]	49,3	50,6	50,1	49,9	Hb-Einwaage [mg]	49,3	50,6	50,1	49,9
AAValPFPPTH [pmol/g Hb]	39,71	40,49	40,54	38,01	GAValPFPPTH [pmol/g Hb]	10,46	21,48	6,36	11,74
Mittelwert	39,69				Mittelwert	12,51			
Standardabweichung	1,18				Standardabweichung	6,40			

Spender 17

AAVal [pmol/g Hb]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	GAVal [pmol/g Hb]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
Peak Area [counts]	1301443	1227646	1127073	1286211	Peak Area [counts]	66540	97310	127604	56796
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	9,94	9,94	9,94	9,94	n IntStd [pmol]	9,56	9,56	9,56	9,56
Peak Area IntStd [counts]	5918911	5877010	5323542	5614100	Peak Area IntStd [counts]	833951	903009	812818	923045
n AAVaIPFPPTH [pmol]	2,19	2,08	2,10	2,28	n GAValPFPPTH [pmol]	0,76	1,03	1,50	0,59
Hb-Einwaage [mg]	49,3	49	50,8	49,6	Hb-Einwaage [mg]	49,3	49	50,8	49,6
AAValPFPPTH [pmol/g Hb]	44,33	42,37	41,43	45,91	GAValPFPPTH [pmol/g Hb]	15,47	21,02	29,54	11,86
Mittelwert	43,51				Mittelwert	19,48			
Standardabweichung	2,01				Standardabweichung	7,70			

Spender 18

AAVal [pmol/g Hb]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	GAVal [pmol/g Hb]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
Peak Area [counts]	277743	395296	1068303	299981	Peak Area [counts]	37946	53755	111218	127435
V IntStd	20µl	20µl	20µl	100µl	V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	11,18	11,18	11,18	55,9	n IntStd [pmol]	9,56	9,56	9,56	9,56
Peak Area IntStd [counts]	1874076	2790092	5741061	13723386	Peak Area IntStd [counts]	302397	276975	558618	647152
n AAVaIPFPPTH [pmol]	1,66	1,58	2,08	1,22	n GAValPFPPTH [pmol]	1,20	1,86	1,90	1,88
Hb-Einwaage [mg]	49,8	49,8	49,8	46,7	Hb-Einwaage [mg]	49,8	49,8	49,8	49,8
AAValPFPPTH [pmol/g Hb]	33,27	31,81	41,77	26,17	GAValPFPPTH [pmol/g Hb]	24,09	37,26	38,22	37,80
Mittelwert	33,25				Mittelwert	34,34			
Standardabweichung	6,45				Standardabweichung	6,85			

Spender 19

AAVal [pmol/g Hb]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	GAVal [pmol/g Hb]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
Peak Area [counts]	465462	537403	410647	440137	Peak Area [counts]	77370	113447	87666	128731
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	11,18	11,18	11,18	11,18	n IntStd [pmol]	9,56	9,56	9,56	9,56
Peak Area IntStd [counts]	3625553	4122078	3473811	3078403	Peak Area IntStd [counts]	973254	1186481	1075521	1348968
n AAVaIPFPPTH [pmol]	1,44	1,46	1,32	1,60	n GAValPFPPTH [pmol]	0,76	0,91	0,78	0,91
Hb-Einwaage [mg]	50,5	50,5	50,5	50,5	Hb-Einwaage [mg]	50,4	50,4	49,5	49,5
AAValPFPPTH [pmol/g Hb]	28,42	28,86	26,17	31,65	GAValPFPPTH [pmol/g Hb]	15,08	18,14	15,74	18,43
Mittelwert	28,78				Mittelwert	16,85			
Standardabweichung	2,25				Standardabweichung	1,68			

Spender 20

AAVal [pmol/g Hb]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	GAVal [pmol/g Hb]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
Peak Area [counts]	714804	757797	735093	202012	Peak Area [counts]	124090	138286	121921	211976
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	11,18	11,18	11,18	11,18	n IntStd [pmol]	9,56	9,56	9,56	9,56
Peak Area IntStd [counts]	3808497	4320637	3842867	1194478	Peak Area IntStd [counts]	577359	590943	802908	998197
n AAVaIPFPPTH [pmol]	2,10	1,96	2,14	1,89	n GAValPFPPTH [pmol]	2,05	2,24	1,45	2,03
Hb-Einwaage [mg]	51,9	51,9	51,9	51,9	Hb-Einwaage [mg]	51,9	51,9	51,9	51,9
AAValPFPPTH [pmol/g Hb]	40,43	37,78	41,21	36,43	GAValPFPPTH [pmol/g Hb]	39,59	43,10	27,97	39,12
Mittelwert	38,96				Mittelwert	37,45			
Standardabweichung	2,24				Standardabweichung	6,56			

3.2.2. Raucher

Spender 21

AAVal [pmol/g Hb]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
Peak Area [counts]	515774	860978	856616	873416
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	124	124	124	124
Peak Area IntStd [counts]	2391341	4300990	3658701	3482676
n AAVaIPFPPTH [pmol]	26,74	24,82	29,03	31,10
Hb-Einwaage [mg]	299	294	292	281
AAValPFPPTH [pmol/g Hb]	89,45	84,43	99,43	110,67
Mittelwert	95,99			
Standardabweichung	11,60			

Spender 22

AAVal [pmol/g Hb]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
Peak Area [counts]	402360	325869	286523	246014
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	621	621	621	621
Peak Area IntStd [counts]	22342461	20889858	29016809	31640670
n AAVaIPFPPTH [pmol]	11,18	9,69	6,13	4,83
Hb-Einwaage [mg]	221	190	240	158
AAValPFPPTH [pmol/g Hb]	50,60	50,99	25,55	30,56
Mittelwert	39,42			
Standardabweichung	13,29			

Spender 23

AAVal [pmol/g Hb]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	GAVal [pmol/g Hb]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
Peak Area [counts]	1940166	1753989	1918825	1660511	Peak Area [counts]	98872	137273	103451	111203
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	9,94	9,94	9,94	9,94	n IntStd [pmol]	9,56	9,56	9,56	9,56
Peak Area IntStd [counts]	2754810	2771651	2647196	2550402	Peak Area IntStd [counts]	511057	644691	499510	539853
n AAVaIPFPPTH [pmol]	7,00	6,29	7,21	6,47	n GAValPFPPTH [pmol]	1,85	2,04	1,98	1,97
Hb-Einwaage [mg]	49	49,2	49,8	49,8	Hb-Einwaage [mg]	49	49,2	49,8	49,8
AAValPFPPTH [pmol/g Hb]	142,87	127,85	144,68	129,95	GAValPFPPTH [pmol/g Hb]	37,75	41,37	39,76	39,54
Mittelwert	136,34				Mittelwert	39,60			
Standardabweichung	8,66				Standardabweichung	1,48			

Spender 24

AAVal [pmol/g Hb]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	GAVal [pmol/g Hb]	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4
Peak Area [counts]	4108349	5397755	5438440	5114219	Peak Area [counts]	639980	724207	845878	533553
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	9,98	9,98	9,98	9,98	n IntStd [pmol]	8,86	8,86	8,86	8,86
Peak Area IntStd [counts]	936812	1437194	1256861	934402	Peak Area IntStd [counts]	471027	587751	631444	541716
n AAVaIPFPPTH [pmol]	43,77	37,48	43,18	54,62	n GAValPFPPTH [pmol]	12,04	10,92	11,87	8,73
Hb-Einwaage [mg]	54	47,1	50,9	55,7	Hb-Einwaage [mg]	54	47,1	50,9	55,7
AAValPFPPTH [pmol/g Hb]	810,50	795,81	848,40	980,67	GAValPFPPTH [pmol/g Hb]	222,93	231,78	233,18	156,67
Mittelwert	858,84				Mittelwert	211,14			
Standardabweichung	84,18				Standardabweichung	36,60			

3.3. Dosimetrie mittels GC/MS

3.3.1.AAVal

Inkubationszeit 1h

Spende 1 (A110)	Blindwert			Inkubation mit 0,3µM AA			Inkubation mit 3µM AA			Inkubation mit 10µM AA						
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Peak Area [counts]	2222721	2155730	1288561	2314733	2901779	2724445	3137993	2866013	4985925	4641198	4574588	4990093	9923782	9711816	8823532	10762993
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	9,94	9,94	9,94	9,94	9,94	9,94	9,94	9,94	9,94	9,94	9,94	9,94	9,94	9,94	9,94	9,94
Peak Area IntStd [counts]	13688830	12418578	5553843	11335379	13815087	13473176	13898224	13390901	13541271	13203126	13989997	13586967	13577432	14323765	13316559	14396163
n AAVaIPFPPTH [pmol]	1,61	1,73	2,31	2,03	2,09	2,01	2,24	2,13	3,66	3,49	3,25	3,65	7,27	6,74	6,59	7,43
Hb-Einwaage [mg]	49,4	50,3	52,4	52,1	48,6	47	54	49,7	52,3	52,7	49,2	50,3	50,1	48,8	45,2	49,5
AAValPFPPTH [pmol/g Hb]	32,67	34,30	44,01	38,96	42,96	42,77	41,56	42,81	69,98	66,30	66,06	72,58	145,01	138,11	145,71	150,13
Mittelwert	37,49			42,52			68,73			144,74						
Standardabweichung	5,10			0,65			3,13			4,97						
Spende 2 (A111)	Blindwert			Inkubation mit 0,3µM AA			Inkubation mit 3µM AA			Inkubation mit 10µM AA						
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Peak Area [counts]	2043336	1939458	2378932	2678391	3481283	3274682	2752326	3601072	5100834	5878008	5040056	5440048	11976532	14677406	13396793	15687006
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98
Peak Area IntStd [counts]	13218419	13642918	12911104	14132034	17399859	17976684	17893442	20977068	15086008	17366329	18916335	18400775	17736320	18525948	17563116	18310866
n AAVaIPFPPTH [pmol]	1,54	1,42	1,84	1,89	2,00	1,82	1,54	1,71	3,37	3,38	2,66	2,95	6,74	7,91	7,61	8,55
Hb-Einwaage [mg]	45,5	47,3	53,4	49,9	54	54,3	49,5	49,7	51,6	54,4	54,3	53,9	50,8	52,3	52,6	53,8
AAValPFPPTH [pmol/g Hb]	33,91	29,99	34,44	37,91	36,98	33,48	31,01	34,47	65,40	62,09	48,97	54,74	132,66	151,18	144,73	158,92
Mittelwert	34,06			33,99			57,80			146,87						
Standardabweichung	3,24			2,47			7,38			11,11						
Spende 3 (A77)	Blindwert			Inkubation mit 0,3µM AA			Inkubation mit 3µM AA			Inkubation mit 10µM AA						
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Peak Area [counts]	131105	0	162151	138104	621613	584277	624759	563502	997067	973838	1079606	1084385	3928202	4754479	5591391	218602
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98
Peak Area IntStd [counts]	431193	0	552359	559590	2828294	2763704	2917250	2894640	2921175	2912466	2708239	3337849	3928202	2742233	3716379	556283
n AAVaIPFPPTH [pmol]	3,03	0,00	2,93	2,46	2,19	2,11	2,14	1,94	3,41	3,34	3,98	3,24	9,98	17,30	15,02	3,92
Hb-Einwaage [mg]	51,9	0	54,6	54	51,8	50,4	54,6	51	54,7	52,1	52,7	50,3	51,8	54,7	53,1	51,4
AAValPFPPTH [pmol/g Hb]	58,47	0,00	53,66	45,61	42,34	41,86	39,15	38,09	62,27	64,05	75,49	64,46	192,66	316,33	282,77	76,30
Mittelwert	52,58			40,36			66,57			263,92						
Standardabweichung	6,50			2,07			6,02			63,95						

Inkubationszeit 4h

Spender 4 (A108)	Blindwert			Inkubation mit 0,3µM AA			Inkubation mit 3µM AA			Inkubation mit 10µM AA		
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Peak Area [counts]	2231932	2358221	2532052	2145818	3249853	3305305	3530496	4082551	11283773	8793137	8871083	8789995
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98
Peak Area IntStd [counts]	12671122	12365846	11751303	11568496	13514337	13983490	12738195	13315975	12153532	12274373	12443627	12039603
n AAVaIPFPPTH [pmol]	1,76	1,90	2,15	1,85	2,40	2,36	2,77	3,06	9,27	7,15	7,11	7,29
Hb-Einwaage [mg]	48,3	50,4	52,1	47,7	47,4	48,6	51,6	55,9	55,6	47,4	50	49
AAVaIPFPPTH [pmol/g Hb]	36,40	37,76	41,27	38,81	50,63	48,54	53,61	54,74	166,65	150,83	142,30	148,70
Mittelwert	38,56			51,88			152,12			418,10		
Standardabweichung	2,06			2,82			10,34			28,26		
Spender 5 (A109)	Blindwert			Inkubation mit 0,3µM AA			Inkubation mit 3µM AA			Inkubation mit 10µM AA		
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Peak Area [counts]	2935847	3228712	3347247	3283811	4914650	4434513	4734333	3836987	11175230	14451209	10216843	13111679
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98
Peak Area IntStd [counts]	16242270	13877790	16101226	14644188	16621086	15776536	16323994	15008389	16921851	16290597	16551586	16305169
n AAVaIPFPPTH [pmol]	1,80	2,32	2,07	2,24	2,95	2,81	2,89	2,55	6,59	8,85	6,16	8,03
Hb-Einwaage [mg]	45,6	54,9	54	48,6	50,4	51	48,3	52,4	53,7	49,7	49,6	50,6
AAVaIPFPPTH [pmol/g Hb]	39,56	42,29	38,42	46,05	58,55	55,00	59,93	48,69	122,73	178,13	124,20	158,60
Mittelwert	41,58			55,54			145,92			374,93		
Standardabweichung	3,39			5,02			27,13			28,12		
Spender 6 (A74)	Blindwert			Inkubation mit 0,3µM AA			Inkubation mit 3µM AA			Inkubation mit 10µM AA		
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Peak Area [counts]	204546	274744	199301	134999	556177	509323	732067	782805	1534525	1519123	2061511	2052107
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98
Peak Area IntStd [counts]	1030465	1381744	1206010	841002	2579944	2263973	2988800	3291025	2098120	2338265	3201294	2741379
n AAVaIPFPPTH [pmol]	1,98	1,98	1,65	1,60	2,15	2,25	2,44	2,37	7,30	6,48	6,43	7,47
Hb-Einwaage [mg]	53,2	53,4	52,3	51,5	50,3	50,9	52	53,5	53,8	51,8	50,6	53
AAVaIPFPPTH [pmol/g Hb]	37,24	37,16	31,53	31,11	42,77	44,11	47,01	44,37	135,67	125,17	127,01	140,96
Mittelwert	34,26			44,57			132,20			765,91		
Standardabweichung	3,40			1,77			7,42			188,62		

3.3.2. GAVal

Inkubationszeit 1h

Spender 7 (A112)	Blindwert			Inkubation mit 0,3µM GA			Inkubation mit 3µM GA			Inkubation mit 10µM GA						
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Peak Area [counts]	99433	74063	99698	0	164070	91454	135199	131684	411662	346092	324160	293745	752984	713961	418850	806254
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7
Peak Area IntStd [counts]	3271228	3738817	3429879	0	3606193	2804603	3254769	2978993	3157186	3212946	3136719	2804255	3035678	3135955	3092610	3231817
n GAValPFPTH [pmol]	0,29	0,19	0,28	0,00	0,44	0,32	0,40	0,43	1,26	1,04	1,00	1,02	2,41	2,21	1,31	2,42
Hb-Einwaage [mg]	46,5	47	46,3	47,6	46,5	47	46,3	47,6	46,5	47	46,3	47,6	46,5	47	46,3	47,6
GAValPFPTH [pmol/g Hb]	6,34	4,09	6,09	0,00	9,49	6,73	8,70	9,01	27,20	22,23	21,65	21,35	51,74	46,99	28,37	50,84
Mittelwert	5,51			8,48			23,11			44,49						
Standardabweichung	1.23			1.21			2.75			10.94						

Spender 8 (A113)	Blindwert			Inkubation mit 0,3µM GA			Inkubation mit 3µM GA			Inkubation mit 10µM GA							
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	
Peak Area [counts]	238249	220353	157608	159685	232692	81726	197204	174020	409788	308780	416619	303502	910975	1126198	834734	854055	
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	
n IntStd [pmol]	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	9,98	
Peak Area IntStd [counts]	5059676	4037597	4539927	4470800	5104738	4933405,65	4800254,89	4468458,92	4975655	5549033,72	4385115,98	3797291,7	4576747,5	5499368,59	5350351,38	4867108,14	
n GAValPFPTH [pmol]	0,47	0,54	0,35	0,36	0,45	0,17	0,41	0,39	0,82	0,56	0,95	0,80	1,99	2,04	1,56	1,75	
Hb-Einwaage [mg]	49,6	49,2	49,5	47,4	49,4	48	50,4	47,9	47,7	52,9	50,4	54,7	45,4	48	49,2	49,5	
GAValPFPTH [pmol/g Hb]	9,47	11,07	7,00	7,52	9,21	3,44	8,13	8,11	17,23	10,50	18,81	14,58	43,75	42,58	31,65	35,38	
Mittelwert	8,77			8,49			15,28			38,34							
Standardabweichung	1,87			0,63			3,64			5,80							

Inkubationszeit 4h

Spender 9 (A95)	Blindwert			Inkubation mit 0,3µM GA			Inkubation mit 3µM GA			Inkubation mit 10µM GA						
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Peak Area [counts]	87016	65599	75214	107198	111650	140335	147935	132863	200930	0	377433	361904	847976	875566	830750	1040338
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7
Peak Area IntStd [counts]	949193	1043426	917556	1221226	1113455	1079519	1204481	1304503	1027318	0	1209381	1192316	1127405	1155476	1188527	1476693
n GAValPFPTH [pmol]	0,89	0,61	0,80	0,85	0,97	1,26	1,19	0,99	1,90	0,00	3,03	2,94	7,30	7,35	6,78	6,83
Hb-Einwaage [mg]	50	49,4	44,6	54,1	49,4	53,1	55,6	54,3	53	47,5	47,8	52	47	54,3	51,4	49
GAValPFPTH [pmol/g Hb]	17,78	12,34	17,83	15,74	19,69	23,75	21,43	18,19	35,80	0,00	63,33	56,62	155,23	135,36	131,91	139,46
Mittelwert	15,92			20,76			51,92			140,49						
Standardabweichung	2,58			2,39			14,36			10,30						

Spender 10 (A100)	Blindwert				Inkubation mit 0,3µM GA			Inkubation mit 3µM GA			Inkubation mit 10µM GA						
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	
Peak Area [counts]	61170	103768	89178	78962				434121	325789	590580	433024	710624	529085	1239149	832334		
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl				20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	
n IntStd [pmol]	9,7	9,7	9,7	9,7				9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	
Peak Area IntStd [counts]	1252659	1277176	1188274	1386079				1042729	1334850	1552845	1210059	1579799	1550141	1479806	1563033		
n GAVaIPFPTH [pmol]	0,47	0,79	0,73	0,55				4,04	2,37	3,69	3,47	4,36	3,31	8,12	5,17		
Hb-Einwaage [mg]	49,3	50,2	50,9	51,6				49,5	53,1	53,6	52,7	55,9	52,1	53,2	53		
GAVaIPFPTH [pmol/g Hb]	9,61	15,70	14,30	10,71				81,58	44,58	68,83	65,87	78,05	63,55	152,68	97,46		
Mittelwert	12,58							65,22			97,93						
Standardabweichung	2,89							15,35			39,05						

Spender 11 (A101)	Blindwert				Inkubation mit 0,3µM GA				Inkubation mit 3µM GA				Inkubation mit 10µM GA			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Peak Area [counts]	43992	96782	81618	64565					434121	107208	87821	10631	619549	105536	590784	562664
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl					20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	9,7	9,7	9,7	9,7					9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7
Peak Area IntStd [counts]	1834560	1651894	1386189	1087110					1337891	313681	539133	689380	1510491	1435723	914051	537992
n GAVaIPFPTH [pmol]	0,23	0,57	0,57	0,58					3,15	3,32	1,58	0,15	3,98	0,71	6,27	10,14
Hb-Einwaage [mg]	54,9	47,2	51,3	52,5					51,3	48,9	45,8	50,9	49	49,6	47	48,4
GAVaIPFPTH [pmol/g Hb]	4,24	12,04	11,13	10,97					61,35	67,80	34,50	2,94	81,20	14,38	133,39	209,60
Mittelwert	9,60								54,55				141,40			
Standardabweichung	3,60								17,66				64,58			

Spender 12 (A102)	Blindwert				Inkubation mit 0,3µM GA				Inkubation mit 3µM GA				Inkubation mit 10µM GA			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Peak Area [counts]	36369	57204	44244	52155					292137	283660	269432	143182	1125166	899494	1006514	919210
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl					20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	9,7	9,7	9,7	9,7					9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7
Peak Area IntStd [counts]	1535216	1423958	1409668	1455563					1569271	1377589	1365047	1615072	1402955	1622734	1507563	1558589
n GAVaIPFPTH [pmol]	0,23	0,39	0,30	0,35					1,81	2,00	1,91	0,86	7,78	5,38	6,48	5,72
Hb-Einwaage [mg]	48,6	52,9	48,8	48,3					48,7	53,5	49,2	53	51,7	54,8	50,8	54,4
GAVaIPFPTH [pmol/g Hb]	4,73	7,37	6,24	7,20					37,08	37,33	38,91	16,23	150,47	98,12	127,48	105,16
Mittelwert	6,38								37,78				120,31			
Standardabweichung	1,21								0,99				23,69			

Spender 13 (A103)	Blindwert				Inkubation mit 0,3µM GA				Inkubation mit 3µM GA				Inkubation mit 10µM GA			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Peak Area [counts]	40916	53131	51793	35513					412033	275713	236915	376835	1190601	892888	1204390	722571
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl					20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	9,7	9,7	9,7	9,7					9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7
Peak Area IntStd [counts]	1240011	1663787	1243778	937069					1216403	1123762	1059067	1217768	1370830	1192457	1397225	857172
n GAVaIPFPTH [pmol]	0,32	0,31	0,40	0,37					3,29	2,38	2,17	3,00	8,42	7,26	8,36	8,18
Hb-Einwaage [mg]	49,7	51,6	51,6	48,2					52,3	50	50,4	46,4	56	53,3	50,9	54,7
GAVaIPFPTH [pmol/g Hb]	6,44	6,00	7,83	7,63					62,82	47,60	43,05	64,69	150,44	136,27	164,27	149,48
Mittelwert	6,97								54,54				150,12			
Standardabweichung	0,89								10,83				11,44			

Spender 14 (A104)	Blindwert				Inkubation mit 0,3µM GA				Inkubation mit 3µM GA				Inkubation mit 10µM GA			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Peak Area [counts]	136581	140752	137064	65369	153878	78547	53539	46798	72274	74361	56396	80157	142387	111047	132001	111615
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7
Peak Area IntStd [counts]	499261	556690	639876	263840	454289	348867	212175	86843	215392	250197	204778	251604	268258	223850	241130	242205
n GAVaIPFPTH [pmol]	2,65	2,45	2,08	2,40	3,29	2,18	2,45	5,23	3,25	2,88	2,67	3,09	5,15	4,81	5,31	4,47
Hb-Einwaage [mg]	56,5	48,4	52,3	52,2	55,6	48,8	47,5	48,8	51,4	50,1	54,8	49,1	52,6	49,3	48,7	49,2
GAVaIPFPTH [pmol/g Hb]	46,97	50,67	39,73	46,04	59,09	44,75	51,53	107,11	63,32	57,54	48,75	62,94	97,88	97,61	109,04	90,85
Mittelwert	45,85				51,79				61,27				98,84			
Standardabweichung	4,55				7,17				3,23				7,53			

Spender 15 (A105)	Blindwert			Inkubation mit 0,3µM GA			Inkubation mit 3µM GA			Inkubation mit 10µM GA						
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Peak Area [counts]	25803	30170	19724	44183	36252	111156	104158	53170	53794	104225	77819	94336	159563	111669	173349	150341
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7
Peak Area IntStd [counts]	342100	366732	195291	322507	304347	401497	493488	311114	312413	412004	330248	294054	266248	168743	303009	288246
n GAVaIPFPTH [pmol]	0,73	0,80	0,98	1,33	1,16	2,69	2,05	1,66	1,67	2,45	2,29	3,11	5,81	6,42	5,55	5,06
Hb-Einwaage [mg]	46,3	47,1	53,5	47,5	54,6	52	51,2	50,1	51,9	49,8	52,6	51,4	56,4	50	47,6	50
GAVaIPFPTH [pmol/g Hb]	15,80	16,94	18,31	27,98	21,16	51,64	39,99	33,09	32,18	49,27	43,45	60,54	103,07	128,38	116,58	101,18
Mittelwert	19,76			36,47				46,36				112,31				
Standardabweichung	5,57			12,76				11,82				12,72				

Spender 16 (A106)	Blindwert			Inkubation mit 0,3µM GA			Inkubation mit 3µM GA			Inkubation mit 10µM GA						
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Peak Area [counts]	254622	244914	158122	214749	292759	231181	287548	241052	945567	810788	714628	920335	2277963	2481495	2988233	3036888
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7
Peak Area IntStd [counts]	1710607	1403671	1367403	1489227	1732424	1742207	1744574	1458260	1894217	1862068	1738291	1890753	2703081	2080002	2161848	2361527
n GAVaIPFPTH [pmol]	1,44	1,69	1,12	1,40	1,64	1,29	1,60	1,60	4,84	4,22	3,99	4,72	8,17	11,57	13,41	12,47
Hb-Einwaage [mg]	50,4	56,7	52,1	47,4	54,9	52,6	52,4	54,4	48,3	50	48,2	55	52,8	55,2	54	49,8
GAVaIPFPTH [pmol/g Hb]	28,65	29,85	21,53	29,51	29,86	24,47	30,51	29,47	100,25	84,47	82,73	85,85	154,82	209,64	248,29	250,48
Mittelwert	27,38			28,58				88,33				215,81				
Standardabweichung	3,94			2,77				8,05				44,78				

Spender 17 (A107)	Blindwert			Inkubation mit 0,3µM GA			Inkubation mit 3µM GA			Inkubation mit 10µM GA						
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
Peak Area [counts]	466905	330336	407237	395861	431747	495162	432863	440642	1539144	1321611	1022081	1058678	2995828	2147451	3963926	3721984
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7	9,7
Peak Area IntStd [counts]	1923998	2309147	2363386	1978594	2526492	2405339	2458788	2175764	2907223	2819547	2612404	2429264	3290878	2237398	3314511	3064933
n GAVaIPFPTH [pmol]	2,35	1,39	1,67	1,94	1,66	2,00	1,71	1,96	5,14	4,55	3,80	4,23	8,83	9,31	11,60	11,78
Hb-Einwaage [mg]	54,1	50,3	55,7	49,5	49	46,4	50,1	50,8	49,9	53,4	52,9	47,8	46,2	46,5	56,9	54,2
GAVaIPFPTH [pmol/g Hb]	43,51	27,59	30,01	39,21	33,83	43,04	34,09	38,67	102,91	85,14	71,74	88,44	191,13	200,22	203,88	217,33
Mittelwert	35,08			37,40				87,06				203,14				
Standardabweichung	7,53			4,36				12,80				10,87				

3.4. In vivo Adduktbildung von Acrylamid und Glycidamid mit dem N-terminalen Valin des Hämoglobins im Rahmen der humanen Verzehrsstudie „Bedeutung der CYP2E1-Aktivität für die Toxikokinetik von Acrylamid beim Menschen“

3.4.1. Proband 04 Studienperiode R

AA-Val	pre			0,5 h							1 h		1,5 h		2 h			2,5 h							
	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 5	Messwert 6	Messwert 7	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3			
Peak Area [counts]	1214271	1068303	141535	27774	395296	299981	380996	1137936	982988	204667	331480	5419	847237	739068	260146	847237	830835	130669	1107604	723958	157249				
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	100µl	100µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl				
n IntStd [pmol]	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	55,92	55,92	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18				
Peak Area IntStd [counts]	6339265	5741061	1245942	1874076	2790092	13723386	12915240	6069714	5824562	1687647	2411401	42744	5342788	5495403	1830232	4716310	4357734	1160412	5912917	5135461	1371999				
n AAValPFPPTH [pmol]	2,14	2,08	1,27	1,66	1,58	1,22	1,65	2,10	1,89	1,36	1,54	1,42	1,77	1,50	1,59	2,01	2,13	1,26	2,09	1,58	1,28				
Hb-Einwaage [mg]	49,8	49,8	49,8	49,8	49,8	46,7	54,4	50,3	50,3	50,3	50,3	52,7	53,1	53,1	53,1	52,2	52,2	52,2	50,8	50,8	50,8				
AAValPFPPTH [pmol/g Hb]	43,00	41,77	25,50	33,27	31,81	26,17	30,32	41,67	37,51	26,96	30,55	26,90	33,39	28,32	29,93	38,47	40,83	24,12	41,23	31,03	25,22				
Mittelwert	33,12			34,17							26,90		30,54		34,48			32,49							
Standardabweichung	6,93			6,65							2,59		9,05		8,10			8,10							
3 h	4 h			5 h			6 h			7 h			10 h			12 h									
Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3				
751494	625123	171030	583174	447032	1257483	737349	231789	1603686	626796	369237	1034539	621294	162634	730492	170934	1212700	482433	185871	1052512	794027	266053				
20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl				
11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18				
3578497	3219618	1191303	3831918	2572348	5451869	3786230	1603089	8364626	3041548	2153172	5720993	3589619	1403195	3652330	1445877	5972306	2429237	1375299	5021713	3494099	1741652				
2,35	2,17	1,61	1,70	1,94	2,58	2,18	1,62	2,14	2,30	1,92	2,02	1,94	1,30	2,24	1,32	2,27	2,22	1,51	2,34	2,54	1,71				
52,4	52,4	52,4	51,5	51,5	49,9	49,9	49,9	50,5	50,5	50,5	50,7	50,7	50,7	52,3	52,3	49,9	49,9	49,9	51,7	51,7	51,7				
44,81	41,43	30,63	33,04	37,73	51,68	43,63	32,39	42,44	45,62	37,96	39,88	38,17	25,56	42,75	25,27	45,49	44,49	30,28	45,32	49,14	33,03				
38,95	35,38			42,57			42,01			34,53			40,09			42,50									
7,40	3,31			9,69			3,85			7,82			8,51			8,42									
16 h	24 h																								
Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 1	Messwert 2																					
1088328	660563	256640	413865	395353																					
20µl	20µl	20µl	100µl	100µl																					
11,18	11,18	11,18	55,92	55,92																					
4521664	3088113	1628388	12760767	12361867																					
2,69	2,39	1,76	1,81	1,79																					
52,6	52,6	52,6	45,3	46,3																					
51,16	45,46	33,50	40,04	38,63																					
43,37	39,33																								
9,01	1,00																								
GA-Val	pre			0,5 h							1 h		1,5 h		2 h		2,5 h		3 h		4 h		5 h		
Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2
Peak Area [counts]	37946	53755	111218	127435	97384	123425	41903	36754	4771	98666	92638	34050	62759	90868	105410	88851	109152	53505	31788	103280	116241				
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl				
n IntStd [pmol]	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54				
Peak Area IntStd [counts]	302397	276975	558618	647152	404859	696234	326686	287292	433313	443820	530634	234711	253129	349139	410796	394844	629524	237422	249490	593315	670508				
n acGValPFPPTH [pmol]	1,20	1,85	1,90	1,88	2,29	1,69	1,22	1,22	0,11	2,12	1,67	1,38	2,37	2,48	2,45	2,15	1,65	2,15	1,22	1,66	1,65				
Hb-Einwaage [mg]	49,8	49,8	49,8	49,8	50,3	50,3	50,3	50,3	51,7	53,1	53,1	52,2	52,2	50,8	50,8	52,4	52,4	51,5	51,5	49,9	49,9				
acGValPFPPTH [pmol/g Hb]	24,04	37,18	38,14	37,72	45,62	33,62	24,33	24,26	2,03	39,94	31,37	26,51	45,31	48,88	48,19	40,97	31,57	41,75	23,60	33,28	33,14				
Mittelwert	34,27			31,96							2,03		35,65		35,91		48,53		36,27		32,67		33,21		
Standardabweichung	6,83			10,11							6,06		13,29		0,49		6,65		12,83		0,10		0,10		

7 h				8 h		10 h		12 h		16 h		24 h	
Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2
122675	149617	29370	16386	112168	107441	62248	68468	49733	47820	124681	102336	26246	121108
20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	100µl
9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	47,7
528693	589008	282597	268572	469034	581351	294774	371492	258139	232030	589773	640612	257346	4847764
2,21	2,42	0,99	0,58	2,28	1,76	2,01	1,76	1,84	1,97	2,02	1,52	0,97	1,19
50,5	50,5	50,7	50,7	52,3	52,3	49,9	49,9	51,7	51,7	52,6	52,6	20	45,3
43,83	47,99	19,56	11,48	43,62	33,71	40,37	35,24	35,55	38,03	38,34	28,97	48,65	26,31
45,91		15,52		38,67		37,80		36,79		33,66		37,48	
2,94		5,71		7,01		3,63		1,75		6,62		15,80	

Studienperiode T1

AA-Val	pre	0,5 h		1 h		1,5 h		2 h		2,5 h		3 h	
	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3
Peak Area [counts]	745654	340082	461359	629137	570111	590993	774388	758438	248585	812698	846614	302712	997130
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18
Peak Area IntStd [counts]	3608890	2028719	2935571	3967007	3629078	3678762	3870642	3867743	1758807	3850347	3900452	1530384	5129969
n AAVaIPFPPTH [pmol]	2,31	1,87	1,76	1,77	1,76	1,80	2,24	2,19	1,58	2,36	2,43	2,21	2,17
Hb-Einwaage [mg]	50,5	50,5	50,5	50,5	50,2	50,4	50,4	50,1	50,1	50,1	50,1	50,1	50,1
AAValPFPPTH [pmol/g Hb]	45,74	37,11	34,79	35,11	34,99	35,78	44,38	43,50	31,35	47,10	48,44	44,14	43,38
Mittelwert	38,19				35,38		39,74		45,76		47,24		48,66
Standardabweichung	5,14				0,56		7,28		2,40		3,67		5,77

4 h	5 h		6 h		7 h		8 h		10 h		12 h		16 h	
Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3
785052	580236	340898	601509	689297	372418	906138	671327	239038	793344	849158	338615	948346	955652	1110925
20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18
3601552	2748840	2043732	3112421	3241026	1971234	3441132	2712299	1163855	3071926	3118422	1485684	3383718	3422377	3568439
2,44	2,36	1,86	2,16	2,38	2,11	2,94	2,77	2,30	2,89	3,04	2,55	3,13	3,12	3,48
49,9	49,9	49,9	50,4	50,4	50,4	50	50	50	50,8	50,8	50,6	50,6	50,6	50,6
48,84	47,29	37,37	42,67	47,18	41,91	58,88	55,34	45,92	56,84	59,93	50,16	61,92	68,79	67,40
44,50			43,99			53,38		55,64		57,75		65,68		66,37
6,22			2,81			6,70		4,99		7,03		4,24		9,21

24 h	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 5
	996566	1014624	456363	571057	401698
	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
	11,18	11,18	11,18	55,92	55,92
	3317092	3954036	1721723	10661130	9494583
	3,36	2,87	2,96	3,00	2,37
	50,2	50,2	50,2	48,6	46,7
	66,91	57,15	59,03	61,63	50,66
	59,08				
	5,97				

GA-Val	pre	0,5 h		1 h		1,5 h		2 h		2,5 h		3 h		4 h	5 h	6 h		7 h	
	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2
Peak Area [counts]	40519	47251	123537	121674	133797	54622	54091	51692	46906	120149	153719	38013	77748	83489	46569	37382	104664	98237	39583
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54
Peak Area IntStd [counts]	265464	303518	783738	704494	734981	390308	323445	333425	336318	852049	840083	237375	272535	237636	265162	240430	795455	673203	197339
n acGAValPFPPTH [pmol]	1,46	1,49	1,50	1,65	1,74	1,34	1,60	1,48	1,33	1,35	1,75	1,53	2,72	3,35	1,68	1,48	1,26	1,39	1,91
Hb-Einwaage [mg]	50,5	50,5	50,5	50,5	50,2	50,2	50,4	50,4	50,1	50,1	50,1	50,3	50,1	50,1	50,2	49,9	50,4	50,4	50
acGAValPFPPTH [pmol/g Hb]	28,83	29,41	29,78	32,63	34,60	26,60	31,66	29,35	26,56	26,85	34,84	30,37	54,32	66,90	33,38	29,72	24,91	27,62	38,27
Mittelwert	30,16				30,60		30,50		29,42		30,37		60,61		31,55	29,14	26,26		31,72
Standardabweichung	1,69				5,66		1,63		4,70				8,89				1,92		9,27

8 h		10 h		12 h		16 h		24 h	
Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2
41051	105059	49418	47402	45641	40661	182325	138923		
20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	100µl	100µl		
9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	47,696901	47,696901		
239771	565684	230866	238772	235320	214383	4394166	4004651		
1,63	1,77	2,04	1,89	1,85	1,81	1,98	1,65		
50,6	50,6	50,6	49,8	49,8	50	48,6	46,7		
32,28	35,02	40,36	38,03	37,15	36,19	40,72	35,43		
33,65		40,36	37,59		36,19	38,08			
1,93			0,62			3,74			

Studienperiode T2

AA-Val	pre		0,5 h		1 h		1,5 h		2 h		2,5 h	
	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2
Peak Area [counts]	710103	900247	991402	465700	487077	715941	674688	827445	811980	641262	707726	771074
V IntStd	20µl	20µl	20µl	100µl	100µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	11,18	11,18	11,18	55,92	55,92	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18
Peak Area IntStd [counts]	2616229	3191941	3566094	10501233	10252557	2503808	2580635	2676940	2663965	2309804	2634692	2698352
n AAVaIPFPPTH [pmol]	3,03	3,15	3,11	2,48	2,66	3,20	2,92	3,46	3,41	3,10	3,00	3,19
Hb-Einwaage [mg]	50,2	50,2	50,2	46,3	45,1	50,2	50,2	50,9	50,9	50,9	50,4	50,4
AAValPFPPTH [pmol/g Hb]	60,45	62,81	61,91	53,56	58,91	63,68	58,23	67,89	66,95	60,98	59,59	63,39
Mittelwert	59,53					60,95		65,27		59,89		61,28
Standardabweichung	3,65					3,86		3,75		3,36		2,77

3 h	4 h		5 h		6 h		7 h		8 h		10 h	
	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2
751495	727413	479264	706718	717813	472652	872372	880001	537110	794566	761375	564287	785988
20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18
2524970	2488302	2015409	2311672	2346716	1699138	2901688	2879639	1720896	2598105	2507408	2076714	2595340
3,33	3,27	2,66	3,42	3,42	3,11	3,36	3,42	3,49	3,42	3,39	3,04	3,39
49,9	49,9	49,9	50,5	50,5	50,5	50,6	50,6	50,6	50,8	50,8	50,3	50,3
66,68	65,50	53,28	67,68	67,72	61,58	66,43	67,52	68,96	67,31	66,83	59,80	60,31
61,82			65,66			67,64		64,64		65,39		62,62
7,42			3,53			1,27		4,20		3,41		10,99

12 h		16 h		24 h	
Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2
841715	862963	476909	834001	827742	619992
20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18
2576823	2631631	1790670	2813974	2898265	1991619
3,65	3,67	2,98	3,31	3,19	3,48
50	50	50	49,9	49,9	48
73,04	73,32	59,55	66,40	63,99	69,75
68,64			66,71		69,98
7,87			2,89		2,98

GA-Val	pre		0,5 h		1 h		1,5 h		2 h		2,5 h		3 h		4 h		5 h	
	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2
Peak Area [counts]	31673	226286	179536	242125	40279	76538	95404	33375	32869	55353	55348	93718	39530	66971	65444	88251	39370	48319
V IntStd	20µl	100µl	100µl	20µl	20µl	100µl	100µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	9,54	47,696901	47,696901	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54
Peak Area IntStd [counts]	233794	3989412	3758644	1354848	386672	328548	290520	207405	200464	211147	201562	297921	210870	251096	215549	369591	156184	158295
n acGAVaIPFPPTH [pmol]	1,29	2,71	2,28	1,70	0,99	2,22	3,13	1,54	1,56	2,50	2,62	3,00	1,79	2,54	2,90	2,28	2,40	2,91
Hb-Einwaage [mg]	50,2	46,3	45,1	45,6	50,2	50,2	50,2	50,9	50,9	50,4	50,4	50,1	50,3	50,3	49,9	50,5	50,5	50,6
acGAVaIPFPPTH [pmol/g Hb]	25,75	58,43	50,52	37,39	19,80	44,27	62,41	30,16	30,73	49,62	51,98	59,90	35,70	50,59	57,58	45,65	47,62	57,66
Mittelwert	43,02				42,16		30,45		50,80		47,80		54,08		45,65	52,64		87,20
Standardabweichung	14,42				21,38		0,40		1,67		17,12		4,95		7,10		19,17	

6 h		7 h		8 h		10 h		12 h		16 h		24 h				
Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 4	Messwert 5
58121	42776	48068	39244	22813	33244	43990	42061	17738	31852	55720	82397	56802	61117	23912	151737	258928
20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	100µl	20µl
9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	47,70	9,54
165997	180949	158959	174698	97674	106374	168976	132204	333023	307882	210137	221067	348856	155635	133944	3911940	1377358
3,34	2,26	2,88	2,14	2,23	2,98	2,48	3,04	0,51	0,99	2,53	3,56	1,55	3,75	1,70	1,85	1,79
50,8	50,8	50,3	50,3	50,4	50,4	50,2	50,2	50	50	49,9	49,9	49,9	48	48	45,2	45,9
65,75	44,39	57,35	42,61	44,21	59,16	49,47	60,46	10,16	19,74	50,69	71,26	31,13	78,05	35,48	40,93	39,07
55,07		49,98		51,68		54,97		14,95		51,03			49,88			
15,10		10,43		10,57		7,77		6,77		20,07			17,56			

3.4.2.Proband 07 Studienperiode R

	pre								0,5 h				1 h				1,5 h			
AA-Val	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 5	Messwert 6	Messwert 7	Messwert 8	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4
Peak Area [counts]	435857	565774	582458	272693	980173	1389354	388452	374717	384719	474815	526471	400409	446887	553907	483223	332316	477608	616312	604784	396335
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	100µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	55,92	55,92	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18
Peak Area IntStd [counts]	1990449	2621927	2922635	1279331	4329559	6274428	11686113	11034456	1751191	2266740	3163221	1883562	1961619	2539691	2856474	1639415	2076735	2657873	3225602	1769372
n AAVaIPFPTH [pmol]	2,45	2,41	2,23	2,38	2,53	2,48	1,86	1,90	2,46	2,34	1,86	2,38	2,55	2,44	1,89	2,27	2,57	2,59	2,10	2,50
Hb-Einwaage [mg]	52,2	52,2	52,2	52,2	52,2	52,2	48,5	51,7	51,1	51,1	51,1	51,1	50,3	50,3	50,3	50,3	50,2	50,2	50,2	50,2
AAValPFPPTH [pmol/g Hb]	46,90	46,22	42,68	45,65	48,49	47,43	38,33	36,73	48,07	45,83	36,41	46,51	50,64	48,48	37,60	45,05	51,22	51,64	41,76	49,89
Mittelwert	44,05								44,20				45,44				48,63			
Standardabweichung	4,39								5,28				5,71				4,64			

2 h			2,5 h				3 h				4 h				5 h				6 h				7 h			
Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	
475342	582380	545530	518879	633896	585586	439653	417518	518206	483270	310706	511409	640418	315870	506708	605288	346609	490100	577847	281780	570440	697631	757564				
20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	
11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18		
2033299	2619499	2325728	2144188	2703742	2924664	1851235	1749995	2191015	2455345	1370120	2224060	2787991	1292815	2254357	2766331	1476607	2078715	2545324	1165295	2420832	3060637	3216298				
2,61	2,49	2,62	2,71	2,62	2,24	2,66	2,67	2,64	2,20	2,54	2,57	2,57	2,73	2,51	2,45	2,62	2,64	2,54	2,70	2,63	2,55	2,63				
52,4	52,4	52,4	52	52	52	52	50,9	50,9	50,9	50,9	51,7	51,7	51,7	51,1	51,1	51,1	51,3	51,3	51,3	50,3	50,3	50,3				
49,88	47,43	50,05	52,03	50,41	43,05	51,06	52,40	51,95	43,23	49,81	49,72	49,67	52,84	49,18	47,87	51,36	51,38	49,48	52,70		50,66	52,35				
49,12			49,14				49,35			50,74			49,47				51,19			51,80						
1,46			4,11				4,23			1,81			1,76				1,62			0,98						

8 h	10 h				12 h				16 h				24 h				
Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 5
609173	740506	434492	591339	674906	367251	554493	549314	648418	619811	724143	665489	652131	623802	641507	683984	2215306	2767788
20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18
2601267	3295603	1904624	2394857	2973507	1518998	2295276	2309334	2589743	2524743	3017723	3383789	2630402	2482389	2489644	2906082	9677305	13652978
2,62	2,51	2,55	2,76	2,54	2,70	2,70	2,66	2,80	2,74	2,68	2,20	2,77	2,81	2,88	2,63	2,56	2,27
51,5	51,5	51,5	51,2	51,2	51,2	52,2	52,2	50,3	50,3	50,3	50,3	50,3	51,1	51,1	51,1	51,1	51,1
50,84	48,78	49,52	53,92	49,56	52,79	51,74	50,95	53,63	54,57	53,34	43,71	55,10	54,98	56,37	51,49	50,08	44,35
49,71			52,09			52,10		51,68		51,46			51,46				
1,04			2,26			1,38		5,36		4,72			4,72				

GA-Val	pre	0,5 h		1 h		1,5 h		2 h		2,5 h		3 h		4 h		5 h		6 h		7 h	
	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	
Peak Area [counts]	62744	114991	66437	67170	139911	157373	108052	184642	127144	258091	176659	251706	170407	232237	198118	140100	185043	62975	66316	155803	227419
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54
Peak Area IntStd [counts]	581674	587132	493931	537731	1281489	1260887	929876	1215382	906132	1314808	1167278	1307832	994431	1224602	1350960	1094542	1351269	397535	388898	1047054	1375801
n acGAVaIPFPTH [pmol]	1,03	1,87	1,28	1,19	1,04	1,19	1,11	1,45	1,34	1,87	1,44	1,84	1,63	1,81	1,40	1,22	1,31	1,51	1,63	1,42	1,58
Hb-Einwaage [mg]	52,2	52,2	51,1	51,1	50,3	50,3	50,2	50,2	52,4	52,4	52	52	50,9	50,9	51,7	51,1	51,1	51,3	51,3	50,3	50,3
acGAVaIPFPTH [pmol/g Hb]	19,71	35,79	25,11	23,32	20,71	23,67	22,08	28,87	25,55	35,74	27,77	35,31	32,12	35,54	27,06	23,90	25,57	29,46	31,71	28,22	31,35
Mittelwert	27,75		24,22		22,19		25,48		30,64		31,54		33,83		27,06	24,73		30,59		29,79	
Standardabweichung	11,37		1,27		2,10		4,80		7,21		5,33		2,42		1,18		1,59		2,21		

8 h		10 h		12 h		16 h		24 h	
Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2
178531	292489	179627	291874	208323	287578	143755	272714	122827	82305
20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54
1099217	1516848	1163872	1594142	937299	1187785	1111224	1643147	551367	524284
1,55	1,84	1,47	1,75	2,12	2,31	1,23	1,58	2,13	1,50
51,5	51,5	51,2	51,2	52,2	52,2	50,3	50,3	51,1	51,1
30,09	35,72	28,76	34,12	40,62	44,25	24,54	31,48	41,59	29,31
32,90		31,44		42,43		28,01		35,45	
3,98		3,79		2,57		4,91		8,68	

Studienperiode T1

AA-Val	pre								0,5 h				1 h				1,5 h			
	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 5	Messwert 6	Messwert 7	Messwert 8	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4
Peak Area [counts]	548308	623013	468368	230634	1654534	1787141	290583	256984	418918	454849	317483	155420	467946	503524	316709	214023	545287	586015	457655	253993
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	100µl	100µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	55,92	55,92	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18
Peak Area IntStd [counts]	3135101	3655541	3307266	1380582	10156621	11250904	10361314	10462807	2610783	2933432	2442956	963577	2769880	3104795	2365976	1246413	2964451	3366223	2593164	1452008
n AAValPFPTH [pmol]	1,96	1,91	1,58	1,87	1,82	1,78	1,57	1,37	1,79	1,73	1,45	1,80	1,89	1,81	1,50	1,92	2,06	1,95	1,97	1,96
Hb-Einwaage [mg]	49,5	49,5	49,5	49,5	49,5	49,5	51,6	51,4	49,3	49,3	49,3	49,3	50,2	50,2	50,2	50,2	51	51	51	51
AAValPFPTH [pmol/g Hb]	39,50	38,49	31,99	37,73	36,79	35,88	30,39	26,72	36,39	35,16	29,47	36,58	37,62	36,12	29,81	38,24	40,32	38,16	38,69	38,35
Mittelwert	34,69								34,40				35,45				38,88			
Standardabweichung	4,50								3,34				3,86				0,99			

6 h		7 h				8 h				10 h				12 h				16 h			
Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 1	Messwert 3
560423	593304	350640	203742	572260	608176	468693	333641	615215	640135	387605	276268	674918	750340	497482	391643	687569	758891	509721	238409	690038	744495
20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18
2668533	2919388	2068094	1058400	2765407	3046228	2561247	1649756	2662700	2887385	2111389	1250888	2895384	3224526	2606363	1718891	3166254	3440769	2602806	1149465	2763295	3098532
2,35	2,27	1,90	2,15	2,23	2,05	2,26	2,58	2,48	2,05	2,47	2,61	2,60	2,13	2,55	2,43	2,47	2,19	2,32	2,79	2,69	2,21
50,5	50,5	50,5	50,5	50,5	50,5	50,5	50,5	50,7	50,7	50,7	50,7	49,8	49,8	49,8	49,8	49,8	49,8	49,8	49,8	50,2	50,2
46,49	44,99	37,54	42,62	45,81	44,20	40,51	44,77	50,95	48,89	40,48	48,70	52,33	52,24	42,85	51,15	48,75	49,51	43,96	46,56	55,61	53,51
42,91				43,82				47,26				49,64				47,20				51,04	
3,92				2,31				4,63				4,56				2,49				6,19	

24 h	
Messwert 1	Messwert 2
337441	354479
100µl	100µl
55,92	55,92
10827742	10068496
1,74	1,97
45,5	49,9
38,30	39,45
38,88	
0,82	

GA-Val	pre		0,5 h		1 h		1,5 h		2 h		2,5 h		3 h		4 h		5 h		6 h	
	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2
Peak Area [counts]	73644	52297	202408	295145	269305	343143	307013	419833	235492	295964	251471	386963	253341	260363	205142	297372	38486	81000	154691	218341
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54
Peak Area IntStd [counts]	591812	600155	1609633	1990309	1731182	2118553	1732599	2131622	1727844	2181772	1671569	2251535	1721272	1993574	1700368	2059122	566429	506863	1636206	1993021
n acGAValPFPTH [pmol]	1,19	0,83	1,20	1,41	1,48	1,55	1,69	1,88	1,30	1,29	1,44	1,64	1,40	1,25	1,15	1,38	0,65	1,52	0,90	1,05
Hb-Einwaage [mg]	49,5	49,5	49,3	49,3	50,2	50,2	51	51	50,2	50,2	51	51	50,4	50,4	50,8	50,8	49,9	49,9	50,5	50,5
acGAValPFPTH [pmol/g Hb]	23,98	16,79	24,33	28,70	29,56	30,78	33,15	36,84	25,90	25,78	28,14	32,15	27,86	24,72	22,66	27,12	12,99	30,55	17,86	20,70
Mittelwert	20,39		26,51		30,17		34,99		25,84		30,15		26,29		24,89		21,77		19,28	
Standardabweichung	5,08		3,08		0,86		2,61		0,09		2,83		2,22		3,16		12,42		2,01	

7 h		8 h		10 h		12 h		16 h		24 h	
Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2
253481	340001	185573	250500	217280	370758	142798	189364	168116	270091		
20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl		
9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54		
1664514	2046054	1766125	2118836	1771639	2116295	1604427	1887362	1581325	2013207		
1,45	1,59	1,00	1,13	1,17	1,67	0,85	0,96	1,01	1,28		
50,5	50,5	50,7	50,7	49,8	49,8	49,8	49,8	50,2	50,2		
28,77	31,39		22,25	23,49	33,56		17,05	20,20	25,50		
30,08		21,01		28,53		18,14		22,85			
1,86		1,75		7,12		1,53		3,74			

Studienperiode T2

AA-Val	pre				0,5 h				1 h				1,5 h			
	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 5	Messwert 6	Messwert 7	Messwert 8	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4
Peak Area [counts]	465462	537403	410647	440137	849243	951789	223610	253634	533099	582973	370568	306122	514365	522745	385735	209665
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	100µl	100µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	55,92	55,92	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18
Peak Area IntStd [counts]	3625553	4122078	3473811	3078403	6402648	7187149	9106057	10606915	3432400	3818224	2751517	2048577	3269342	3417790	2752517	1486776
n AAVaiPFPTH [pmol]	1,44	1,46	1,32	1,60	1,48	1,48	1,37	1,34	1,74	1,71	1,51	1,67	1,76	1,71	1,57	1,58
Hb-Einwaage [mg]	50,5	50,5	50,5	50,5	50,5	50,5	45,7	52,9	50,4	50,4	50,4	50,4	49,5	49,5	49,5	50,9
AAValPFPTH [pmol/g Hb]	28,42	28,86	26,17	31,65	29,36	29,32	30,05	25,28	34,45	33,87	29,87	33,15	35,53	34,54	31,65	31,85
Mittelwert	28,64								32,84				33,40			
Standardabweichung	2,05								2,04				1,94			

2 h				2,5 h				3 h				4 h				5 h			
Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4
562568	635481	570731	578043	570318	683975	464585	334216	568921	668334	474971	555459	531055	591677	498196	583387	611228	625142	483295	741871
20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18
3791948	4226438	4261214	4037440	3537157	4183156	3270381	2274803	3744681	4082828	3519104	3196507	3351809	3953346	3456900	3384538	3460900	3737905	3600010	4266697
1,66	1,68	1,50	1,60	1,80	1,83	1,59	1,64	1,70	1,83	1,51	1,94	1,77	1,67	1,61	1,93	1,97	1,87	1,50	1,94
49,8	49,8	49,8	49,8	50,6	50,6	50,6	50,6	51,1	51,1	51,1	51,1	50,4	50,4	50,4	50,4	52,5	52,5	52,5	52,5
33,31	33,76	30,07	32,14	35,62	36,13	31,39	32,46	33,24	35,81	29,53	38,02	35,15	33,20	31,97	38,24	37,61	35,61	28,59	37,03
32,32				33,90				34,15				34,64				34,71			
1,65				2,33				3,65				2,73				4,17			

7 h				8 h				10 h				12 h				16 h			
Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4
530551	556919	408059	614457	657538	691732	543757	542974	591361	455608	493294	560106	562076	458371	593834	637322	507708	630389	645787	534078
20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18
3407267	3800416	3375962	3544111	3687862	3981499	3342146	3265608	3675370	3284066	2312331	3075197	3261276	2826363	3064132	3560729	2829375	3289354	3240987	3072293
1,74	1,64	1,35	1,94	1,99	1,94	1,82	1,86	1,80	1,55	2,39	2,04	1,93	1,81	2,17	2,00	2,01	2,14	2,23	1,94
50,8	50,8	50,8	50,8	51,4	51,4	51,4	53,1	53,1	53,1	53,1	51,6	51,6	51,6	51,4	51,4	51,4	52,4	52,4	52,4
34,27	32,25	26,60	38,16	38,78	37,79	35,39	35,01	33,88	29,21	44,92	39,46	37,34	35,14	42,15	38,93	39,03	40,89	42,51	37,09
32,82				37,32			35,75				37,31			40,04			40,16		
4,82				1,74			6,60				2,16			1,83			2,78		

24 h							
Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 5	Messwert 6	Messwert 7	Messwert 8
728498	828457	515895	318276	1538862	1423634	218093	229689
20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	100µl	100µl
11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	55,92	55,92
3654431	4228540	2719882	1747301	7081739	7550922	9333444	9811628
2,23	2,19	2,12	2,04	2,43	2,11	1,31	1,31
51	51	51	51	51	51	47,7	46,3
43,70	42,95	41,58	39,93	47,64	41,33	27,39	28,27
39,10							
7,32							

GA-Val	pre	0,5 h		1 h		1,5 h		2 h		2,5 h		3 h		4 h		5 h		6 h		7 h		8 h	
	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	
Peak Area [counts]			77370	113447	87666	128731	170510	94232	106091	103085	142135	133237	150364	96148	141971	120045	157287	128027	153434	148539	125864		
V IntStd			20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	
n IntStd [pmol]			9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	
Peak Area IntStd [counts]			973254	1186481	1075521	1348968	1429793	911270	1182482	1149983	1439030	1281727	1575839	1087193	1325958	1066986	1298145	1156782	1358645	1443117	1347797		
n acGAVaIPFPTH [pmol]			0,76	0,91	0,78	0,91	1,14	0,99	0,86	0,86	0,94	0,99	0,91	0,84	1,02	1,07	1,16	1,06	1,08	0,98	0,89		
Hb-Einwaage [mg]			50,4	50,4	49,5	49,5	50,9	49,8	49,8	50,6	50,6	51,1	51,1	50,4	50,4	52,5	52,5	50,8	50,8	51,4	53,1		
acGAVaIPFPTH [pmol/g Hb]			15,05	18,10	15,71	18,39	22,35	19,81	17,19	16,90	18,62	19,41	17,81	16,74	20,27	20,44	22,02	20,78	21,21	19,10	16,78		
Mittelwert			16,57		17,05		22,35	18,50		17,76		18,61		18,50		21,23		21,00		19,10	16,78		
Standardabweichung			2,16		1,90			1,85		1,22		1,13		2,49		1,11		0,30					

10 h	12 h		16 h		24 h		
Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 3
127541	188369	232499	160269	216315	90217	143630	263071
20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54
1256048	1418811	1529583	1343522	1660395	586837	1430841	1701653
0,97	1,27	1,45	1,14	1,24	1,47	0,96	1,47
51,6	51,6	51,4	52,4	52,4	51	51	51
18,77	24,55	28,21	21,72	23,72	28,76	18,78	28,92
21,66		28,21	22,72		25,48		
4,08			1,41		5,81		

3.4.3.Proband 10

Studienperiode R

	pre		0,5 h					1 h					1,5 h						
AA-Val	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 5	Messwert 6	Messwert 7	Messwert 8	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4
Peak Area [counts]	714804	757797	735093	202012	1025891	1134233	291392	291316	416715	105958	98238	644854	617018	485107	179476	723588	783656	663429	280964
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	100µl	100µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	55,92	55,92	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18
Peak Area IntStd [counts]	3808497	4320637	3842867	1194478	5092642	6316158	9725430	10375501	2920225	553945	591547	3283898	3269873	2939245	1228934	3700404	4050122	3541550	1733709
n AAVaIPFPPTH [pmol]	2,10	1,96	2,14	1,89	2,25	2,01	1,68	1,57	1,60	2,14	1,86	2,20	2,11	1,85	1,63	2,19	2,16	2,09	1,81
Hb-Einwaage [mg]	51,9	51,9	51,9	51,9	51,9	51,9	49,5	45,9	52,3	52,3	52,3	51	51	51	51	51	52,2	52,2	52,2
AAVaIPFPPTH [pmol/g Hb]	40,43	37,78	41,21	36,43	43,39	38,68	33,85	34,21	30,50	40,89	35,50	43,05	41,37	36,18	32,01	41,88	41,44	40,12	34,71
Mittelwert	38,25								35,63			38,15				39,54			
Standardabweichung	3,37								5,19			5,03				3,30			

2 h	2,5 h			3 h			4 h			5 h			6 h		
Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3
652508	715763	618741	216710	669821	655361	599691	489113	475060	377868	853322	822834	716228	196447	575684	565861
20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18
3784989	4053611	3495637	1060428	3603637	3534153	3241085	3194185	3499683	1518810	4058664	3982131	3588481	938010	3293197	3279835
1,93	1,97	1,98	2,28	2,08	2,07	2,07	1,71	1,52	2,78	2,35	2,31	2,23	2,34	1,95	1,93
51,7	51,7	51,7	51,7	51,3	51,3	51,3	51,8	51,8	51,8	50,7	50,7	50,7	51,2	51,2	51,2
37,28	38,18	38,28	44,19	40,51	40,41	40,32	33,05	29,30	53,70	46,36	45,56	44,01	46,18	38,17	37,67
39,48				40,41			38,68		45,53				41,65		40,73
3,17				0,09			13,14		1,07				6,46		6,12

7 h	8 h			10 h			12 h			16 h		
Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3
733451	762769	577062	175695	686841	697726	664308	310228	643032	569769	616073	308028	517928
20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18
3650597	4042767	3136987	810429	3778631	3967086	3731114	1312920	3538444	3354066	3520544	1159511	3364259
2,25	2,11	2,06	2,42	2,03	1,97	1,99	2,64	2,03	1,90	1,96	2,97	1,72
50	50	50	50	52,5	52,5	52,5	52,5	52,6	52,6	52,6	51,3	51,3
44,92	42,19	41,13	48,47	38,71	37,45	37,92	50,32	38,63	36,11	37,19	56,46	33,55
44,18				41,10			42,10			40,81		41,07
3,28				6,17			9,63			11,91		1,01

24 h							
Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 5	Messwert 6	Messwert 7	Messwert 8
818093	874301	700706	159854	1049992	1633158	385470	336357
20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	100µl	100µl
11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	55,92	55,92
3710536	4171969	3356370	764150	5179194	8100685	10537706	10792292
2,46	2,34	2,33	2,34	2,27	2,25	2,05	1,74
51,7	51,7	51,7	51,7	51,7	51,7	47,9	47,3
47,68	45,32	45,15	45,24	43,84	43,60	42,70	36,85
43,80							
3,18							

GA-Val	pre	0,5 h								1 h				1,5 h				2 h				2,5 h				3 h				4 h				5 h			
	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4					
Peak Area [counts]	124090	138286	121921	211976	191265	256068	123689	97224	185399	220131	134712	182823	175726	189267	179447	176952	128128	176498	177180	211758	186993																
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl					
n IntStd [pmol]	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54						
Peak Area IntStd [counts]	577359	590943	802908	998197	904340	1074627	553945	592541	828247	982079	882203	1041752	948809	1064634	837945	924674	823802	1004184	905014	1031458	865479																
n acGAVaIPFPPTH [pmol]	2,05	2,23	1,45	2,03	2,02	2,27	2,13	1,57	2,14	2,14	1,46	1,67	1,77	1,70	2,04	1,83	1,48	1,68	1,87	1,96	2,06																
Hb-Einwaage [mg]	51,9	51,9	51,9	51,9	52,3	52,3	52,3	52,3	51	51	52,2	52,2	51,7	51,7	51,3	51,3	51,8	51,8	50,7	50,7	51,2																
acGAVaIPFPPTH [pmol/g Hb]	39,51	43,01	27,91	39,03	38,58	43,47	40,73	29,93	41,87	41,93	27,91	32,07	34,18	32,80	39,82	35,59	28,64	32,37	36,84	38,63	40,26																
Mittelwert	37,37	38,18								41,90				29,99				33,49				37,71				30,51				37,73				40,26			
Standardabweichung	6,55	5,85								0,04				2,95				0,97				3,00				2,63				1,27							

6 h	7 h		8 h		10 h		12 h		16 h		24 h	
Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3
188048	205008	184859	224810	182009	212821	229535	254023	192860	257933	145300	186866	102897
20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54
843125	1026809	850036	993503	921130	1052303	925960	1085496	944145	1104232	1006430	1150026	589486
2,13	1,90	2,07	2,16	1,89	1,93	2,36	2,23	1,95	2,23	1,38	1,55	1,67
52,1	52,1	50	50	52,5	52,5	52,6	52,6	51,3	51,3	51	51	51,7
40,84	36,56	41,49	43,17	35,91	36,75	44,96	42,44	37,99	43,44	27,01	30,39	32,21
38,70	42,33		36,33		43,70		40,71		28,70		37,27	
3,03	1,19		0,60		1,78		3,86		2,40		4,40	

Studienperiode T1

AA-Val	pre								0,5 h				1 h				1,5 h			
	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 5	Messwert 6	Messwert 7	Messwert 8	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4
Peak Area [counts]	531940	699482	575567	122464	1032787	1222945	344505	418280	364463	472755	458248	150345	311261	434739	479099	158753	348407	586015	470275	141551
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	100µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	55,92	55,92	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18
Peak Area IntStd [counts]	2690454	3745359	2746992	632679	5366619	6360026	11026450	12764171	2291125	3096288	2303184	566562	1827146	2547413	2411500	611703	2248751	2990653	2379226	647885
n AAValPFPPTH [pmol]	2,21	2,09	2,34	2,16	2,15	2,15	1,75	1,83	1,78	1,71	2,22	2,97	1,90	1,91	2,22	2,90	1,73	2,19	2,21	2,44
Hb-Einwaage [mg]	51,8	51,8	51,8	51,8	51,8	51,8	49	50,9	50,9	50,9	50,9	50,9	52,9	52,9	52,9	52,9	50,1	50,1	50,1	50,1
AAValPFPPTH [pmol/g Hb]	42,67	40,31	45,22	41,78	41,54	41,50	35,66	36,07	34,94	33,54	43,70	58,29	36,00	36,07	41,99	54,85	34,57	43,73	44,11	48,75
Mittelwert	40,59	42,62								42,23				42,79						
Standardabweichung	3,25	11,37								8,87				5,94						

2,5 h				3 h				4 h				5 h				6 h				7 h				8 h			
Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3			
410156	443956	455737	140331	732319	733098	149917	543159	683722	509683	568605	716319	608232	642527	680694	578989	614093	568873	680521	585739	501355	638363	603483					
20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl			
11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18			
2191263	2686616	2140451	570255	3505014	3418424	739660	2564676	3238109	2525770	2655066	3416641	3207421	3583613	3494472	3575878	3262187	2848419	3518414	2999354	2815153	3522396	2927490					
2,09	1,85	2,38	2,75	2,34	2,40	2,27	2,37	2,36	2,26	2,39	2,34	2,12	2,00	2,18	1,81	2,10	2,23	2,16	2,18	1,99	2,03	2,30					
52,2	52,2	52,2	52,2	50	50	50	51,7	51,7	51,7	52,7	52,7	52,7	52	52	50,7	50,7	52,9	52,9	52,9	51,5	51,5	51,5					
40,09	35,39	45,60	52,71	46,72	47,95	45,32	45,80	45,66	43,64	45,43	44,48	40,23	38,55	41,88	35,70	41,51	42,21	40,88	41,27	38,66	39,34	44,75					
43,45	46,66			45,03			43,38			40,21			38,61			41,45			40,92								
7,45	1,32			1,21			2,77			2,36			4,11			0,68			3,34								

10 h		12 h			16 h			24 h		
Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 1	Messwert 2
549254	636988	521465	409262	594157	502152	681740	838081	848874	737462	902169
20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18
2637771	3214025	2666273	2154960	2894544	2379226	2728777	3476873	3308563	3334219	3887547
2,33	2,22	2,19	2,12	2,29	2,36	2,79	2,69	2,87	2,47	2,59
52	52	52	52,1	52,1	52,1	53,3	53,3	53,3	51,7	51,7
44,77	42,61	42,05	40,75	44,05	45,29	52,40	50,56	53,82	47,83	50,18
43,14			43,36			52,26			48,26	
1,44			2,34			1,63			5,50	

GA-Val	pre	0,5 h				1 h		1,5 h		2 h		2,5 h		3 h		4 h		5 h		
	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2		
Peak Area [counts]	124121	106201	138842	171508			155772	161571	94997	141436	119652	187276	116365	128788	183375	215166	101354	145379	137718	135157
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl			20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	9,54	9,54	9,54	9,54			9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54
Peak Area IntStd [counts]	704164	662190	1053423	1204131			923829	1026580	926056	1054222	1003476	1145543	1017343	1146232	1074066	1188137	1020775	1191051	1014514	1115018
n acGAVaIPFPTH [pmol]	1,68	1,53	1,26	1,36			1,61	1,50	0,98	1,28	1,14	1,56	1,09	1,07	1,63	1,73	0,95	1,16	1,30	1,16
Hb-Einwaage [mg]	51,8	51,8	51,8	51,8			52,9	52,9	50,1	50,1	52,2	52,2	50	50	51,7	51,7	52,7	52,7	52	52
acGAVaIPFPTH [pmol/g Hb]	32,46	29,54	24,27	26,23			30,41	28,38	19,53	25,55	21,79	29,88	21,82	21,44	31,50	33,42	17,97	22,10	24,90	22,24
Mittelwert	28,13						29,40	22,54	25,83	25,83	21,63	21,63	32,46	32,46	20,03	20,03	23,57	23,57	23,57	23,57
Standardabweichung	3,62						1,43	4,25	4,25	5,72	5,72	0,27	0,27	1,35	1,35	2,91	2,91	1,89	1,89	1,89

6 h		7 h		8 h		10 h		12 h		16 h		24 h	
Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2
135432	174654	139433	147860	106781	111849	191700	104175	173370	146158	169515	82978	106551	
20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54
1018575	1207839	1079569	1248258	627600	1048346	1167648	1021888	1126781	1061003	1172765	654499	627522	
1,27	1,38	1,23	1,13	1,62	1,02	1,57	0,97	1,47	1,31	1,38	1,21	1,62	
50,7	50,7	52,9	52,9	51,5	52	52	52,1	52,1	53,3	51,7	51,7	51,7	
25,02	27,21	23,29	21,36	31,52	19,57	30,12	18,67	28,17	24,66	25,87	23,39	31,33	
26,11		22,33		31,52	24,85		23,42		25,26		27,36		
1,55		1,36		7,46			6,72		0,86		5,61		

Studienperiode T2

AA-Val	pre						0,5 h						1 h			1,5 h			2 h			2,5 h	
	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 5	Messwert 6	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 5	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	
Peak Area [counts]	845720	275091	1120603	1322697	316918	381043	575983	674683	509723	922559	1052803	711139	803932	597678	790810	689477	717221	766380	836560	742453			
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	100µl	100µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	
n IntStd [pmol]	11,18	11,18	11,18	11,18	55,92	55,92	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	
Peak Area IntStd [counts]	3996635	1172989	4961416	6489521	10017009	9749767	3498976	3887152	2187396	4526145	5582538	3828438	4286096	2449348	3715846	3700187	3450132	3697874	3631603	3597193			
n AAVaIPFPPTH [pmol]	2,37	2,62	2,53	2,28	1,77	2,19	1,84	1,94	2,61	2,28	2,11	2,08	2,10	2,73	2,38	2,08	2,32	2,32	2,58	2,31			
Hb-Einwaage [mg]	52,1	52,1	52,1	52,1	47,4	54,2	52	52	52	52	52	52,8	52,8	52,8	51,4	51,4	52,3	52,3	53,2	53,2	53,2		
AAVaIPFPTH [pmol/g Hb]	45,41	50,33	48,47	43,74	37,32	40,32	35,39	37,32	50,10	43,82	40,55	39,33	39,72	51,67	46,29	40,53	44,44	44,30	48,41	43,37			
Mittelwert	44,26						41,44						43,57			43,41			44,37			45,89	
Standardabweichung	4,89						5,81						7,01			4,07			0,10			3,56	

3 h		4 h		5 h		6 h		7 h		8 h		10 h		12 h		16 h	
Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2
818797	925587	827470	852787	877754	903737	916497	1038803	757761	766206	770434	813316	893884	894346	965693	1219780	784707	794115
20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18
4034727	4217601	3950262	4441198	3917660	4244923	4044849	4603210	3810820	3891895	3472086	3711299	4000255	4203420	4599509	5795622	3876789	4061677
2,27	2,45	2,34	2,15	2,50	2,38	2,53	2,52	2,22	2,48	2,45	2,50	2,38	2,35	2,35	2,26	2,19	3,12
51,2	51,2	53	53	50,3	50,3	54	54	51,8	51,8	53,7	53,7	51,5	51,5	51,5	53,8	53,8	53,8
44,31	47,92	44,19	40,50	49,80	47,32	46,91	46,72	42,92	42,49	46,20	45,62	48,51	46,19	45,58	45,69	42,06	40,63
46,12		42,35		48,56		46,82		42,70		45,91		47,35		45,63		45,79	
2,55		2,60		1,75		0,13		0,30		0,40		1,64		0,08		7,08	

24 h

Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 5	Messwert 6
955274	989213	1342652	1583607	391723	365640
20µl	20µl	20µl	20µl	100µl	100µl
11,18	11,18	11,18	11,18	55,92	55,92
4443431	4689794	5778700	6943056	9742821	9113436
2,40	2,36	2,60	2,55	2,25	2,24
53,2	53,2	53,2	53,2	47,7	46,3
45,18	44,33	48,83	47,93	47,13	48,46
46,98					
1,83					

GA-Val	pre	0,5 h				1 h		1,5 h		2 h		2,5 h		3 h		4 h		5 h		6 h	
	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 3	Messwert 4	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2
Peak Area [counts]	136363	133758	142713	167624	119415	199940	133499	104398	101487	172558	133662	152357	171874	215089	101563	101969	89744	111735	117018	114199	
V IntStd	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
n IntStd [pmol]	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54
Peak Area IntStd [counts]	728680	716671	831224	1097869	854520	1052246	1065018	789578	929930	1024111	844684	1024649	823383	1022043	720388	708795	903366	1079931	622996	647729	
n acGAVaIPFPPTH [pmol]	1,79	1,78	1,64	1,46	1,33	1,81	1,20	1,26	1,04	1,61	1,51	1,42	1,99	2,01	1,34	1,37	0,95	0,99	1,79	1,68	
Hb-Einwaage [mg]	52,1	52,1	52,1	52,1	52	52	52,8	51,4	51,4	52,3	53,2	53,2	51,2	51,2	53	53	50,3	50,3	54	54	
acGAVaIPFPPTH [pmol/g Hb]	34,27	34,18	31,44	27,96	25,64	34,86	22,65	24,54	20,26	30,74	28,38	26,66	38,89	39,21	25,38	25,90	18,84	19,62	33,18	31,15	
Mittelwert	31,96				30,25		22,65	22,40		30,74	27,52		38,89		25,64		19,23		32,17		
Standardabweichung	2,97				6,52			3,03			1,21		0,23		0,37		0,55		1,44		

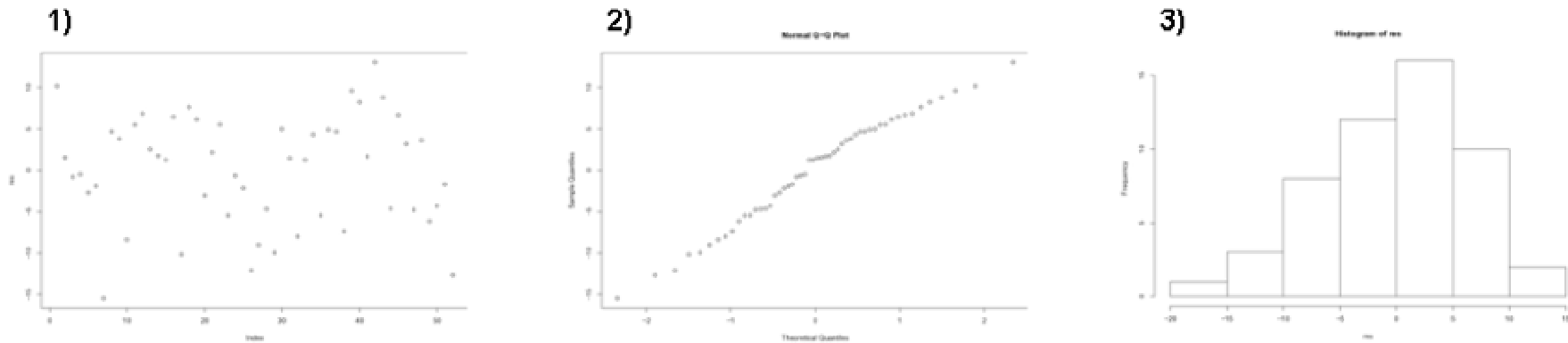
7 h	8 h		10 h		12 h		16 h		24 h	
Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1	Messwert 2	Messwert 1
163717	167730	125698	117746	151829	86341	108916	242661	124251	209062	191431
20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl	20µl
9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54	9,54
948961	1161517	785554	728630	682271	754285	894759	1095600	1092276	1266110	1051898
1,65	1,38	1,53	1,54	2,12	1,09	1,16	2,11	1,09	1,58	1,74
51,8	51,8	53,7	53,7	51,5	51,5	51,5	51,5	53,8	53,8	53,2
31,77	26,60	28,43	28,71	41,22	21,20	22,55	41,03	20,17	29,28	32,63
29,18		28,57		31,21		31,79		24,73		33,02
3,66		0,20		14,16		13,07		6,44		0,54

3.4.4. Statistische Auswertung

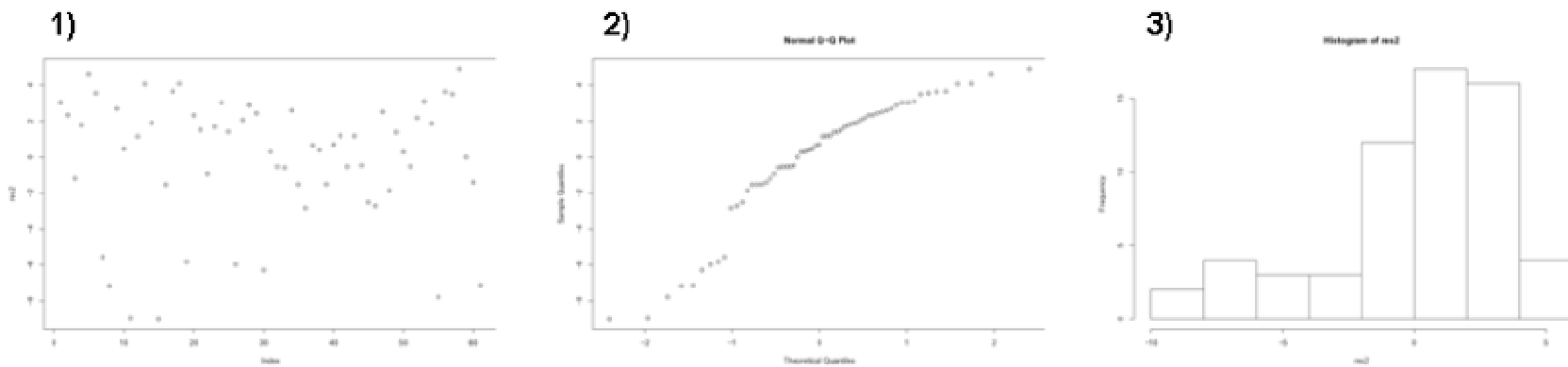
Graphische Darstellung der Residuen für Proband 04 Studienperiode T1 und für Proband 07 Studienperioden R, T1 und T2.

- 1) Residuen aufgetragen gegen Nummerierung (ideal: Werte bilden keine Struktur)
- 2) Normalverteilung (ideal: Werte bilden eine Gerade)
- 3) Histogramm (ideal: Symmetrie)

Proband 04 Studienperiode T1

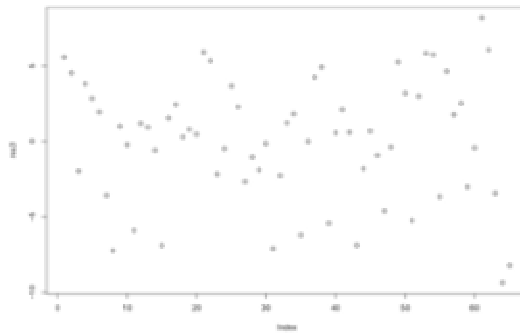


Proband 07 Studienperiode R

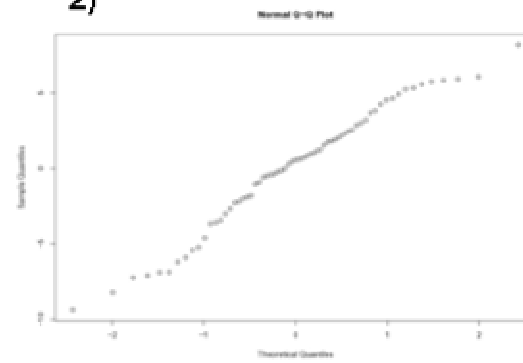


Proband 07 Studienperiode T1

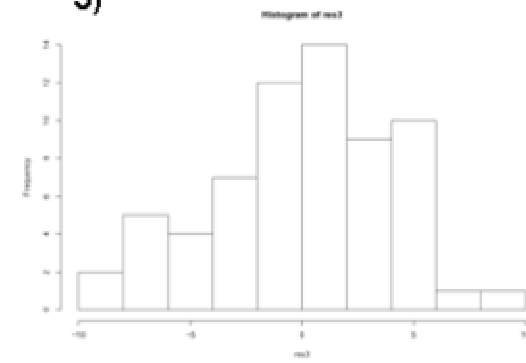
1)



2)

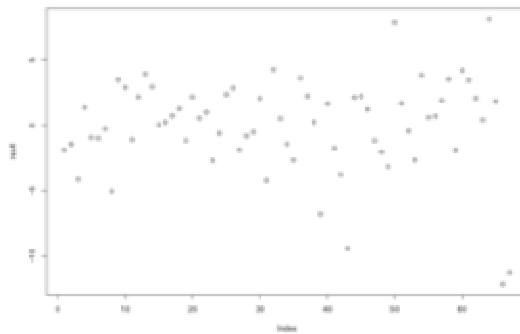


3)

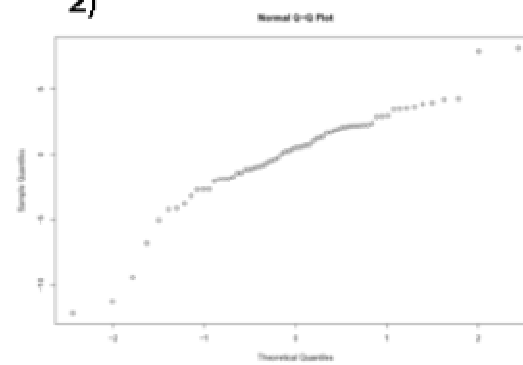


Proband 07 Studienperiode T2

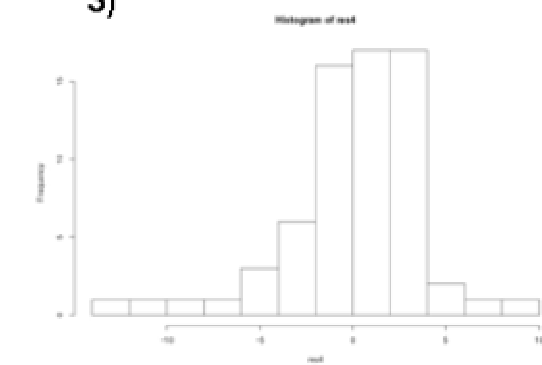
1)



2)



3)



4. Verteilung von ¹⁴C-Acrylamid in humanem Vollblut

4.1. Inkubationen mit 3 µM ¹⁴C-Acrylamid

R 22

3µM, 15min, Spender w/NR

Proben: Messwerte

	Erythrocyten	Waschlg. Ery	Plasma	Thrombocyten	Protein (gefällt)	Proteinfreies Plasma	Vollblut
							Mittelwert
BW	32	25	32	26	32	33	30,00
1	232	1346	4075	428	1000	613	707
2	268	2198	4435	679	916	614	694
3	234	2485	4174	600	850	599	801
4	230	2439	4200	674	708	611	
Mittelwert	241	2117	4221	595	868,5	609,3	734,0
Mittelwert (abzüglich BW)	209	2092	4189	569	836,5	576,3	704,0
Standardabw.	18,07	529,18	152,49	117,20	123,36	6,95	58,39
Standardabw. [%]	7,50	25,00	3,61	19,69	14,20	1,14	7,95
Gesamtvolumen	1450	500	650	975	600	650	1900
gemessenes Volumen [µl]	100	100	100	975	600	100	100

Berechnung (Gravimetrie)

	BW	1	2	3	4	VB
Blut [g]	1,55195	1,64047	1,63598	1,64228	1,60598	1,63509
Erythrocyten lysiert [g]	1,50755	1,56319	1,54969	1,57443	1,53843	
entnommenes Aliquot [g]	0,11456	0,11397	0,11515	0,11507	0,1106	
<i>Faktor (Aliquotierung)</i>	<i>13,15947975</i>	<i>13,7158024</i>	<i>13,45801</i>	<i>13,68236725</i>	<i>13,90985533</i>	
Gesamtplasma [g]	0,63832	0,68384	0,67566	0,67656	0,65708	
Aliquot Plasma [g]	0,10215	0,10322	0,10137	0,1024	0,10225	
Plasmaprotein [g]	0,07946	0,09573	0,08743	0,08937	0,07937	
<i>Faktor (Bezug auf Gesamtplasma)</i>	<i>6,248849731</i>	<i>6,62507266</i>	<i>6,665286</i>	<i>6,60703125</i>	<i>6,426210269</i>	
Proteinfreies Plasma [g]	0,02269	0,00749	0,01394	0,01303	0,02288	
<i>Faktor (Bezug auf Gesamtplasma)</i>	<i>6,248849731</i>	<i>6,62507266</i>	<i>6,665286</i>	<i>6,60703125</i>	<i>6,426210269</i>	
Aceton-Phase [g]	0,49021	0,45789	0,45535	0,4587	0,45936	
Aliquot Aceton-Phase [g]	0,08611	0,08569	0,0888	0,086	0,08756	
<i>Faktor (Aliquotierung)</i>	<i>5,692834746</i>	<i>5,34356401</i>	<i>5,127815</i>	<i>5,33372093</i>	<i>5,246231156</i>	
W-Phase [g]	0,47512	0,45193	0,46928	0,44476	0,46686	
Aliquot W-Phase [g]	0,10144	0,05598	0,08853	0,10444	0,10612	
<i>Faktor (Aliquotierung)</i>	<i>4,683753943</i>	<i>8,073061808</i>	<i>5,300802</i>	<i>4,258521639</i>	<i>4,399359216</i>	

Berechnung

Erythrocyten

Faktorieller Messwert [cpm]	421,10	3182,07	3606,75	3201,67	3199,27
abzüglich BW		2760,96	3185,64	2780,57	2778,16
Mittelwert [cpm]		2876,34			
Standardabw.		206,39			
Standardabw. [%]		7,18			
Quenchung berücksichtigt		21212,97			

Waschlg. Erythrocyten

Faktorieller Messwert [cpm]	117,09	10866,34	11651,16	10582,43	10730,04
abzüglich BW		10749,25	11534,07	10465,33	10612,94
Mittelwert [cpm]		10840,40			
Standardabw.		476,76			
Standardabw. [%]		4,40			
Quenchung berücksichtigt		11924,44			

Plasma

Faktorieller Messwert [cpm]	198,37	25958,53	28285,37	26196,30	24581,24
abzüglich BW		25760,16	28087,00	25997,93	24382,87
Mittelwert [cpm]		26056,99			
Standardabw.		1529,18			
Standardabw. [%]		5,87			
Quenchung berücksichtigt		31294,44			

Plasmaprotein

Faktorieller Messwert [cpm]	199,96	6625,07	6105,40	5615,98	4549,76
abzüglich BW		6425,11	5905,44	5416,01	4349,79
Mittelwert [cpm]		5524,09			
Standardabw.		884,67			
Standardabw. [%]		16,01			
Quenchung berücksichtigt		5645,62			

Proteinfreies Plasma

Faktorieller Messwert [cpm]	1173,93	21701,12	20985,51	21108,80	20598,88
abzüglich BW		20527,19	19811,58	19934,87	19424,95
Mittelwert [cpm]		19924,64			
Standardabw.		456,67			
Standardabw. [%]		2,29			
Quenchung berücksichtigt		23331,76			

Thrombocyten

Faktorieller Messwert [cpm]	26	428	679	600	674
abzüglich BW		402	653	574	648
Mittelwert [cpm]		569,25			
Standardabw. [%]		141,60			
Standardabw.		117,20			

Prozentuale Verteilung [%]	Erythrocyten	Waschlg. Ery	Plasma	Thrombocyten	Summe (berechnet)
	32,63	18,34	48,14	0,88	65001,10
		Gesamtplasma			
		66,49			
		Proteinfreies Plasma	Plasmaprotein		
		74,56	18,04		
Prozentuale Verteilung im Plasma [%]		49,57	11,99		
Prozentuale Verteilung [%]					

R 27

3µM, 15min, Spender m/NR

Proben: **Messwerte**

	Erythrocyten	Waschlsg. Ery	Plasma	Thrombocyten	Protein (gefällt)	Proteinfreies Plasma	Vollblut
BW	29	30	20	36	43	36	Mittelwert 32,33
1	317	2992	5211	706	(1185)	750	486
2	315	2633	4324	694	888	642	483
3	337	2598	4142	(355)	798	670	501
4	295	2544	4107	558	857	574	
Mittelwert	316,0	2691,8	4446,0	652,7	847,7	659,0	490,0
Mittelwert (abzüglich BW)	287,0	2661,8	4426,0	616,7	804,7	623,0	457,7
Standardabw.	17,2	203,5	518,8	82,2	45,7	72,8	9,64
Standardabw. [%]	5,43	7,56	11,67	12,59	5,39	11,05	1,97
Gesamtvolumen	1500	400	600		600	650	1900
entnommenes Volumen [µl]	100	100	100		600	100	100

Berechnung (Gravimetrie)

	BW	1	2	3	4	VB
Blut [g]	1,55002	1,49072	1,62445	1,61827	1,62333	1,54573
Erythrocyten lysiert [g]	1,68842	1,64474	1,74696	1,74753	1,74514	
entnommenes Aliquot [g]	0,11248	0,11638	0,11619	0,11384	0,11566	
<i>Faktor (Aliquotierung)</i>	<i>15,0108464</i>	<i>14,13249699</i>	<i>15,03537</i>	<i>15,35075545</i>	<i>15,08853536</i>	
Gesamtplasma [g]	0,54641	0,52495	0,5642	0,55151	0,55728	
Aliquot Plasma [g]	0,10665	0,10672	0,10566	0,10461	0,10612	
Plasmaprotein [g]	0,08798	0,0861	0,08039	0,09243	0,08648	
<i>Faktor (Bezug auf Gesamtplasma)</i>	<i>5,504281253</i>	<i>5,161242749</i>	<i>5,585033</i>	<i>5,450780787</i>	<i>5,587887296</i>	
Proteinfreies Plasma [g]	0,01129	0,01561	0,02063	0,00875	0,01325	
<i>Faktor (Bezug auf Gesamtplasma)</i>	<i>5,504281253</i>	<i>5,161242749</i>	<i>5,585033</i>	<i>5,450780787</i>	<i>5,587887296</i>	
Aceton-Phase [g]	0,47015	0,46014	0,45979	0,44341	0,4493	
Aliquot Aceton-Phase [g]	0,08278	0,08642	0,08291	0,0823	0,08302	
<i>Faktor (Aliquotierung)</i>	<i>5,679511959</i>	<i>5,32446193</i>	<i>5,545652</i>	<i>5,387727825</i>	<i>5,411948928</i>	
W-Phase [g]	0,38378	0,39064	0,38253	0,39052	0,38578	
Aliquot W-Phase [g]	0,10404	0,10488	0,10409	0,1049	0,10479	
<i>Faktor (Aliquotierung)</i>	<i>3,688773549</i>	<i>3,724637681</i>	<i>3,674993</i>	<i>3,722783603</i>	<i>3,681458154</i>	

Berechnung

Erythrocyten

Faktorieller Messwert [cpm]	435,31	4480,00	4736,14	5173,20	4451,12
abzüglich BW		4044,69	4300,83	4737,89	4015,80
Mittelwert [cpm]		4274,80			
Standardabw.		334,25			
Standardabw. [%]		7,82			
Quenchung berücksichtigt		31526,67			

Waschlsg. Erythrocyten

Faktorieller Messwert [cpm]	110,66	11144,12	9676,26	9671,79	9365,63
abzüglich BW		11033,45	9565,59	9561,13	9254,97
Mittelwert [cpm]		9853,79			
Standardabw.		799,77			
Standardabw. [%]		8,12			
Quenchung berücksichtigt		10839,16			

Plasma

Faktorieller Messwert [cpm]	102,47	25632,63	23089,16	21836,86	21567,56
abzüglich BW		25530,16	22986,69	21734,40	21465,09
Mittelwert [cpm]		22929,09			
Standardabw.		1856,48			
Standardabw. [%]		8,10			
Quenchung berücksichtigt		27537,83			

Plasmaprotein

Faktorieller Messwert [cpm]	236,68	6116,07	4959,51	4349,72	4788,82
abzüglich BW		5879,39	4722,82	4113,04	4552,14
Mittelwert [cpm]		4816,85			
Standardabw.		753,49			
Standardabw. [%]		15,64			
Quenchung berücksichtigt		4922,82			

Proteinfreies Plasma

Faktorieller Messwert [cpm]	1125,42	20610,63	19884,44	19676,11	17358,54
abzüglich BW		19485,21	18759,02	18550,69	16233,12
Mittelwert [cpm]		18257,01			
Standardabw.		1407,46			
Standardabw. [%]		7,71			
Quenchung berücksichtigt		21378,96			

Thrombocyten

Faktorieller Messwert [cpm]	36	706	694	355	558
abzüglich BW		670	658	319	522
Mittelwert [cpm]		542,25			
Standardabw.		163,27			
Standardabw. [%]		30,11			

	Erythrocyten	Waschlsg. Ery	Plasma	Thrombocyten	Summe (berechnet)
Prozentuale Verteilung [%]	44,75	15,39	39,09	0,77	70445,91
		Gesamtplasma			
		54,48			
		Proteinfreies Plasma	Plasmaprotein		
Prozentuale Verteilung im Plasma [%]		77,63	17,88		
Prozentuale Verteilung [%]		42,29	9,74		

R 19

3 µm, 1 h, Spender m/NR

Proben: **Messwerte**

	Erythrocyten	Waschlsg. Ery	Plasma	Thrombocyten	Protein (gefällt)	Proteinfreies Plasma	Vollblut
BW	29	45	35	31	38	21	33
1	246	2759	4493	472	1039	599	731
2	276	2799	4252	400	946	602	791
3	255	2559	4394	381	903	630	654
4	230	2470	4100	511	864	574	
Mittelwert	251,8	2646,8	4309,8	441,0	938,0	601,3	725,3
Mittelwert (abzüglich BW)	222,8	2601,8	4274,8	410,0	900,0	580,3	692,2
Standardabw.	19,2	157,8	171,3	60,9	75,2	22,9	68,7
Standardabw. [%]	7,62	5,96	3,97	13,82	8,02	3,81	9,47
Gesamtvolumen	1500	450	700	975	600	650	1900
entnommenes Volumen [µl]	100	100	100	975	600	100	100

Berechnung (Gravimetrie)

	BW	1	2	3	4	VB
Blut [g]	1,56337	1,62022	1,61785	1,61831	1,63019	1,63375
Erythrocyten lysiert [g]	1,58789	1,61579	1,62948	1,63252	1,62125	
entnommenes Aliquot [g]	0,11097	0,10908	0,11078	0,11108	0,11214	
<i>Faktor (Aliquotierung)</i>	<i>14,3091827</i>	<i>14,8128896</i>	<i>14,7091533</i>	<i>14,6967951</i>	<i>14,4573747</i>	
Gesamtplasma [g]	0,63996	0,66033	0,65731	0,64963	0,64851	
Aliquot Plasma [g]	0,10693	0,10611	0,10661	0,10714	0,10669	
Plasmaprotein [g]	0,08348	0,09027	0,08941	0,09015	0,08948	
<i>Faktor (Bezug auf Gesamtplasma)</i>	<i>6,2624523</i>	<i>6,6338156</i>	<i>6,4600491</i>	<i>6,3577021</i>	<i>6,2446798</i>	
Proteinfreies Plasma [g]	0,01871	0,00927	0,01234	0,01203	0,01437	
<i>Faktor (Bezug auf Gesamtplasma)</i>	<i>6,2624523</i>	<i>6,6338156</i>	<i>6,4600491</i>	<i>6,3577021</i>	<i>6,2446798</i>	
Aceton-Phase [g]	0,46478	0,45135	0,44808	0,44888	0,44911	
Aliquot Aceton-Phase [g]	0,08275	0,08452	0,08494	0,08614	0,08741	
<i>Faktor (Aliquotierung)</i>	<i>5,6166767</i>	<i>5,3401562</i>	<i>5,2752531</i>	<i>5,2110518</i>	<i>5,1379705</i>	
W-Phase [g]	0,41678	0,41507	0,40707	0,41355	0,42069	
Aliquot W-Phase [g]	0,09901	0,10576	0,11232	0,10586	0,10587	
<i>Faktor (Aliquotierung)</i>	<i>4,2094738</i>	<i>3,9246407</i>	<i>3,6241987</i>	<i>3,9065747</i>	<i>3,9736469</i>	

Berechnung

Erythrocyten

Faktorieller Messwert [cpm]	414,97	3643,97	4059,73	3747,68	3325,20
abzüglich BW [cpm]		3229,00	3644,76	3332,72	2910,23
Mittelwert [cpm]		3279,18			
Standardabw.		302,85			
Standardabw. [%]		9,24			
Quenchung berücksichtigt		24183,94			

Waschlsg. Erythrocyten

Faktorieller Messwert [cpm]	189,43	10828,08	10144,13	9996,92	9814,91
abzüglich BW [cpm]		10638,66	9954,71	9807,50	9625,48
Mittelwert [cpm]		10006,59			
Standardabw.		442,37			
Standardabw. [%]		4,42			
Quenchung berücksichtigt		11007,24			

Plasma

Faktorieller Messwert [cpm]	209,47	27960,26	26215,95	26642,47	24921,65
abzüglich BW [cpm]		27750,79	26006,48	26433,00	24712,18
Mittelwert [cpm]		26225,61			
Standardabw.		1252,68			
Standardabw. [%]		4,78			
Quenchung berücksichtigt		31496,96			

Plasmaprotein

Faktorieller Messwert [cpm]	237,97	6892,53	6111,21	5741,00	5395,40
abzüglich BW [cpm]		6654,56	5873,23	5503,03	5157,43
Mittelwert [cpm]		5797,06			
Standardabw.		642,05			
Standardabw. [%]		11,08			
Quenchung berücksichtigt		5924,60			

Proteinfreies Serum

Faktorieller Messwert [cpm]	738,66	21219,94	20515,19	20872,10	18416,78
abzüglich BW [cpm]		20481,28	19776,54	20133,44	17678,12
Mittelwert [cpm]		19517,35			
Standardabw.		1259,45			
Standardabw. [%]		6,45			
Quenchung berücksichtigt		22854,81			

Thrombocyten

Faktorieller Messwert [cpm]	31,00	472,00	400,00	381,00	511,00
abzüglich BW [cpm]		441,00	369,00	350,00	480,00
Mittelwert [cpm]		410,00			
Standardabw.		66,71			
Standardabw. [%]		16,27			

	Erythrocyten	Waschlsg. Ery	Plasma	Thrombocyten	Summe (berechnet)
Prozentuale Verteilung [%]	36,04	16,40	46,94	0,61	67098,14
		Gesamtplasma			
		63,35			
		Proteinfreies Plasma	Plasmaprotein		
Prozentuale Verteilung im Plasma [%]		72,56	18,81		
Prozentuale Verteilung [%]		45,97	11,92		

R 12

3 µM, 4 h, Spender m/NR

Proben: **Messwerte**

	Erythrocyten	Waschlsg. Ery	Plasma	Thrombocyten	Protein (gefällt)	Proteinfreies Plasma	Vollblut
BW	30	44	50	37	46	28	Mittelwert
1	244	2555	4378	438	976	561	39,1666667
2	271	2555	4220	(840)	950	626	710
3	285	2469	4079	358	868	659	872
4	264	2470	4145	385	954	587	752
Mittelwert	266,0	2512,3	4205,5	393,7	937,0	608,3	778,0
Mittelwert (abzüglich BW)	236,0	2468,3	4155,5	356,7	891,0	580,3	738,8
Standardabw.	17,1	49,4	128,6	225,6	47,4	43,1	68,6
Standardabw. [%]	6,42	1,96	3,06	57,31	5,06	7,09	8,82
Gesamtvolumen	1700	400	500	975	600	650	1900
entnommenes Volumen [µl]	100	100	100	975	600	650	100

Berechnung (Gravimetrie)

	BW	1	2	3	4	VB
Blut [g]	1,55071	1,64934	1,63899	1,65127	1,63634	1,57265
Erythrocyten lysiert [g]	1,67149	1,76364	1,72095	1,73207	1,72313	
entnommenes Aliquot [g]	0,11498	0,11279	0,11416	0,11681	0,10834	
<i>Faktor (Aliquotierung)</i>	<i>14,5372239</i>	<i>15,6364926</i>	<i>15,0748949</i>	<i>14,8280969</i>	<i>15,9048366</i>	
Gesamtplasma [g]	0,53737	0,57309	0,54425	0,55127	0,55296	
Aliquot Plasma [g]	0,10691	0,10799	0,1046	0,10706	0,10629	
Plasmaprotein [g]	0,09742	0,08837	0,08165	0,10349	0,08839	
<i>Faktor (Bezug auf Gesamtplasma)</i>	<i>5,0781516</i>	<i>5,5867616</i>	<i>5,2503376</i>	<i>5,4130990</i>	<i>5,4651117</i>	
Proteinfreies Plasma [g]	0,0084	0,01421	0,02201	-0,00165	0,01279	
<i>Faktor (Bezug auf Gesamtplasma)</i>	<i>5,0781516</i>	<i>5,5867616</i>	<i>5,2503376</i>	<i>5,4130990</i>	<i>5,4651117</i>	
Aceton-Phase [g]	0,47759	0,46069	0,46555	0,42654	0,46233	
Aliquot Aceton-Phase [g]	0,08559	0,08147	0,07928	0,08213	0,08244	
<i>Faktor (Aliquotierung)</i>	<i>5,5799743</i>	<i>5,6547195</i>	<i>5,8722250</i>	<i>5,1934738</i>	<i>5,6080786</i>	
W-Phase [g]	0,42685	0,38037	0,42497	0,43688	0,43545	
Aliquot W-Phase [g]	0,10504	0,10567	0,10602	0,10522	0,10521	
<i>Faktor (Aliquotierung)</i>	<i>4,0636900</i>	<i>3,5996025</i>	<i>4,0083946</i>	<i>4,1520623</i>	<i>4,1388651</i>	

Berechnung

Erythrocyten

Faktorieller Messwert [cpm]	436,12	3815,30	4085,30	4226,01	4198,88
abzüglich BW [cpm]		3379,19	3649,18	3789,89	3762,76
Mittelwert [cpm]		3645,25			
Standardabw.		187,56			
Standardabw. [%]		5,15			
Quenchung berücksichtigt		26883,75			

Waschlsg. Ery

Faktorieller Messwert [cpm]	178,80	9196,98	10241,45	10251,44	10223,00
abzüglich BW [cpm]		9018,18	10062,65	10072,64	10044,19
Mittelwert [cpm]		9799,42			
Standardabw.		520,96			
Standardabw. [%]		5,32			
Quenchung berücksichtigt		10779,36			

Plasma

Faktorieller Messwert [cpm]	251,32	23233,52	21957,31	21003,46	21563,83
abzüglich BW [cpm]		22982,20	21705,99	20752,14	21312,51
Mittelwert [cpm]		21688,21			
Standardabw.		947,30			
Standardabw. [%]		4,37			
Quenchung berücksichtigt		26047,54			

Plasmaprotein

Faktorieller Messwert [cpm]	233,59	5452,68	4987,82	4698,57	5213,72
abzüglich BW [cpm]		5219,08	4754,23	4464,97	4980,12
Mittelwert [cpm]		4854,60			
Standardabw.		321,71			
Standardabw. [%]		6,63			
Quenchung berücksichtigt		4961,40			

Proteinfreies Plasma

Faktorieller Messwert [cpm]	793,41	17722,87	19300,31	18526,33	17990,83
abzüglich BW [cpm]		16929,46	18506,90	17732,92	17197,42
Mittelwert [cpm]		17591,68			
Standardabw.		695,59			
Standardabw. [%]		3,95			
Quenchung berücksichtigt		20599,85			

Thrombocyten

Faktorieller Messwert [cpm]	37,00	438,00	(840,00)	358,00	385,00
abzüglich BW [cpm]		401,00	(803,00)	321,00	348,00
Mittelwert [cpm]		356,67			
Standardabw.		40,70			
Standardabw. [%]		11,41			

	Erythrocyten	Waschlsg. Ery	Plasma	Thrombocyten	Summe (berechnet)
Prozentuale Verteilung [%]	41,96	16,83	40,66	0,56	64067,32
		Gesamtplasma			
		57,48			
		Proteinfreies Plasma	Plasmaprotein		
Prozentuale Verteilung im Plasma [%]		79,09	19,05		
Prozentuale Verteilung [%]		45,46	10,95		

R 18

3 µM, 4 h, Spender m/R

Proben: **Messwerte**

	Erythrocyten	Waschlsg. Ery	Serum	Thrombocyten	Protein (gefällt)	Proteinfreies Plasma	Vollblut
BW	30	45	35	51	40	40	40
1	243	2652	4638	342	1046	550	648
2	267	2351	4416	436	904	564	692
3	279	2502	4477	393	972	572	681
4	237	2534	4399	413	999	634	
Mittelwert	256,5	2509,8	4482,5	396,0	980,3	580,0	673,7
Mittelwert (abzüglich BW)	226,5	2464,8	4447,5	345,0	940,3	540,0	633,5
Standardabw.	19,8	123,9	108,9	40,1	59,3	37,1	22,9
Standardabw. [%]	7,73	4,94	2,43	10,12	6,05	6,40	3,40
Gesamtvolumen	1450	450	600	975	600	650	1900
entnommenes Volumen [µl]	100	100	100	975	600	100	100

	BW	1	2	3	4	VB
Berechnung (Gravimetrie)						
Blut [g]	1,53251	1,58016	1,55062	1,592	1,59972	1,57977
Erythrocyten lysiert [g]	1,7246	1,70997	1,70177	1,73514	1,73119	
entnommenes Aliquot [g]	0,10872	0,1086	0,11324	0,10899	0,1122	
<i>Faktor (Aliquotierung)</i>	<i>15,8627667</i>	<i>15,7455801</i>	<i>15,0279936</i>	<i>15,9201762</i>	<i>15,4295009</i>	
Gesamtplasma [g]	0,53506	0,59502	0,56117	0,59436	0,59402	
Aliquot Plasma [g]	0,10681	0,10672	0,10642	0,10813	0,10767	
Plasmaprotein [g]	0,07587	0,07753	0,07305	0,06804	0,06928	
<i>Faktor (Bezug auf Gesamtplasma)</i>	<i>5,2013221</i>	<i>5,8249633</i>	<i>5,4652318</i>	<i>5,8356406</i>	<i>5,7420976</i>	
Proteinfreies Plasma [g]	0,027	0,02462	0,02963	0,03381	0,03417	
<i>Faktor (Bezug auf Gesamtplasma)</i>	<i>5,2013221</i>	<i>5,8249633</i>	<i>5,4652318</i>	<i>5,8356406</i>	<i>5,7420976</i>	
Aceton-Phase [g]	0,47969	0,46653	0,46696	0,46877	0,46985	
Aliquot Aceton-Phase [g]	0,08372	0,08241	0,06781	0,08121	0,08079	
<i>Faktor (Aliquotierung)</i>	<i>5,7296942</i>	<i>5,6610848</i>	<i>6,8863000</i>	<i>5,7723187</i>	<i>5,8156950</i>	
W-Phase [g]	0,34491	0,34855	0,35446	0,33399	0,34032	
Aliquot W-Phase [g]	0,1043	0,1039	0,1039	0,10512	0,10388	
<i>Faktor (Aliquotierung)</i>	<i>3,3069032</i>	<i>3,3546679</i>	<i>3,4115496</i>	<i>3,1772260</i>	<i>3,2760878</i>	

Berechnung

Erythrocyten

Faktorieller Messwert [cpm]	475,88	3826,18	4012,47	4441,73	3656,79
abzüglich BW [cpm]		3350,29	3536,59	3965,85	3180,91
Mittelwert [cpm]		3508,41			
Standardabw.		337,79			
Standardabw. [%]		9,63			
Quenchung berücksichtigt		25874,52			
Waschlsg. Ery					
Faktorieller Messwert [cpm]	148,81	8896,58	8020,55	7949,42	8301,61
abzüglich BW [cpm]		8747,77	7871,74	7800,61	8152,80
Mittelwert [cpm]		8143,23			
Standardabw.		430,76			
Standardabw. [%]		5,29			
Quenchung berücksichtigt		8957,55			

Plasma

Faktorieller Messwert [cpm]	175,33	25859,28	23286,29	24608,80	24269,47
abzüglich BW [cpm]		25683,95	23110,96	24433,47	24094,14
Mittelwert [cpm]		24330,63			
Standardabw.		1062,32			
Standardabw. [%]		4,37			
Quenchung berücksichtigt		29221,09			

Plasmaprotein

Faktorieller Messwert [cpm]	208,05	6092,91	4940,57	5672,24	5736,36
abzüglich BW [cpm]		5884,86	4732,52	5464,19	5528,30
Mittelwert [cpm]		5402,47			
Standardabw.		483,45			
Standardabw. [%]		8,95			
Quenchung berücksichtigt		5521,32			

Proteinfreies Plasma

Faktorieller Messwert [cpm]	1192,08	18136,59	21226,27	19267,92	21171,98
abzüglich BW [cpm]		16944,51	20034,19	18075,84	19979,90
Mittelwert [cpm]		18758,61			
Standardabw.		1513,91			
Standardabw. [%]		8,07			
Quenchung berücksichtigt		21966,33			

Thrombocyten

Faktorieller Messwert [cpm]	51,00	342,00	436,00	393,00	413,00
abzüglich BW [cpm]		291,00	385,00	342,00	362,00
Mittelwert [cpm]		345,00			
Standardabw.		36,61			
Standardabw. [%]		10,61			

	Erythrocyten	Waschlsg. Ery	Plasma	Thrombocyten	Summe (berechnet)
Prozentuale Verteilung [%]	40,18	13,91	45,38	0,54	64398,16
		Gesamtplasma			
		59,29			
		Proteinfreies Plasma	Plasmaprotein		
Prozentuale Verteilung im Plasma [%]		75,17	18,89		
Prozentuale Verteilung [%]		44,57	11,20		

R 23

3 µM, 6 h, Spender m/NR

Proben: **Messwerte**

	Erythrocyten	Waschlsg. Ery	Plasma	Thrombocyten	Protein (gefällt)	Proteinfreies Plasma	Vollblut
BW	24	46	35	33	35	30	34
1	270	2860	4885	592	1543	551	548
2	337	2706	4424	458	1387	524	696
3	296	2657	4289	483	1235	554	678
4	304	2669	4455	483	1307	595	
Mittelwert	301,8	2723,0	4513,3	504,0	1368,0	556,0	640,7
Mittelwert (abzüglich BW)	277,8	2677,0	4478,3	471,0	1333,0	526,0	606,8
Standardabw.	27,6	93,7	258,1	59,8	132,2	29,3	80,8
Standardabw. [%]	9,15	3,44	5,72	11,87	9,66	5,27	12,60
Gesamtvolumen	1650	450	500	975	600	650	1900
entnommenes Volumen [µl]	100	100	100	975	600	100	100

Berechnung (Gravimetrie)

	BW	1	2	3	4	VB
Blut [g]	1,63025	1,56321	1,61659	1,60976	1,63312	1,56389
Erythrocyten lysiert [g]	1,92981	1,86815	1,90667	1,90376	1,91817	
entnommenes Aliquot [g]	0,11296	0,11371	0,11067	0,11203	0,11394	
<i>Faktor (Aliquotierung)</i>	<i>17,0840120</i>	<i>16,4290740</i>	<i>17,2284269</i>	<i>16,9933054</i>	<i>16,8349131</i>	
Gesamtplasma [g]	0,4474	0,42818	0,44689	0,42698	0,4471	
Aliquot Plasma [g]	0,10685	0,1076	0,10683	0,1054	0,10711	
Plasmaprotein [g]	0,07834	0,08324	0,08715	0,08422	0,08932	
<i>Faktor (Bezug auf Gesamtplasma)</i>	<i>4,3504473</i>	<i>4,2247657</i>	<i>4,4312345</i>	<i>4,2557560</i>	<i>4,4223541</i>	
Proteinfreies Plasma [g]	0,0245	0,01811	0,0137	0,01611	0,01178	
<i>Faktor (Bezug auf Gesamtplasma)</i>	<i>4,3504473</i>	<i>4,2247657</i>	<i>4,4312345</i>	<i>4,2557560</i>	<i>4,4223541</i>	
Aceton-Phase [g]	0,4906	0,46117	0,4558	0,45491	0,44777	
Aliquot Aceton-Phase [g]	0,08331	0,08639	0,08761	0,08645	0,0896	
<i>Faktor (Aliquotierung)</i>	<i>5,8888489</i>	<i>5,3382336</i>	<i>5,2026024</i>	<i>5,2621168</i>	<i>4,9974330</i>	
W-Phase [g]	0,33506	0,34079	0,33702	0,34933	0,34293	
Aliquot W-Phase [g]	0,11149	0,10532	0,1058	0,10648	0,1071	
<i>Faktor (Aliquotierung)</i>	<i>3,0052920</i>	<i>3,2357577</i>	<i>3,1854442</i>	<i>3,2807100</i>	<i>3,2019608</i>	

Berechnung

Erythrocyten

Faktorieller Messwert [cpm]	410,02	4435,85	5805,98	5030,02	5117,81
abzüglich BW [cpm]		4025,83	5395,96	4620,00	4707,80
Mittelwert [cpm]		4687,40			
Standardabw.		561,16			
Standardabw. [%]		11,97			
Quenchung berücksichtigt		34569,57			
Waschlsg. Ery					
Faktorieller Messwert [cpm]	138,24	9254,27	8619,81	8716,85	8546,03
abzüglich BW [cpm]		9116,02	8481,57	8578,60	8407,79
Mittelwert [cpm]		8646,00			
Standardabw.		321,06			
Standardabw. [%]		3,71			
Quenchung berücksichtigt		9510,60			

Plasma

Faktorieller Messwert [cpm]	146,55	19439,21	18506,42	17374,93	18596,12
abzüglich BW [cpm]		19292,66	18359,87	17228,37	18449,57
Mittelwert [cpm]		18332,62			
Standardabw.		847,64			
Standardabw. [%]		4,62			
Quenchung berücksichtigt		22017,48			

Plasmaprotein

Faktorieller Messwert [cpm]	152,27	6518,81	6146,12	5255,86	5780,02
abzüglich BW [cpm]		6366,55	5993,86	5103,59	5627,75
Mittelwert [cpm]		5772,94			
Standardabw.		538,60			
Standardabw. [%]		9,33			
Quenchung berücksichtigt		5899,94			

Proteinfreies Plasma

Faktorieller Messwert [cpm]	768,57	12426,59	12080,27	12406,43	13149,75
abzüglich BW [cpm]		11658,01	11311,70	11637,86	12381,18
Mittelwert [cpm]		11747,19			
Standardabw.		451,48			
Standardabw. [%]		3,84			
Quenchung berücksichtigt		13755,95			

Thrombocyten

Faktorieller Messwert [cpm]	33,00	592,00	458,00	483,00	483,00
abzüglich BW [cpm]		559,00	425,00	450,00	450,00
Mittelwert [cpm]		471,00			
Standardabw.		59,84			
Standardabw. [%]		12,70			

	Erythrocyten	Waschlsg. Ery	Plasma	Thrombocyten	Summe (berechnet)
Prozentuale Verteilung [%]	51,93	14,29	33,07	0,71	66568,64
		Gesamtplasma			
		47,36			
		Proteinfreies Plasma	Plasmaprotein		
Prozentuale Verteilung im Plasma [%]		62,48	26,80		
Prozentuale Verteilung [%]		29,59	12,69		

4.2. Inkubationen mit 30 μM ^{14}C -Acrylamid

4.2.1. Versuche ohne Auftrennung der Erythrozytenfraktion

R 21

30 μM , 15 min, Spender w/NR

Proben: **Messwerte**

	Erythrocyten	Waschlsg. Ery	Plasma	Thrombocyten	Protein (gefällt)	Proteinfreies Plasma	Vollblut
							Mittelwert
BW	27	29	41	26	38	32	32
1	1555	19522	33329	4338	6779	4187	6306
2	1288	15728	29331	4718	5736	4002	5765
3	1594	20168	33587	5118	6809	4667	5266
4	1670	20500	35777	5101	7757	5745	
Mittelwert	1526,8	18979,5	33006,0	4818,8	6770,3	4650,3	5779,0
Mittelwert (abzüglich BW)	1499,8	18950,5	32965,0	4792,8	6732,3	4618,3	5746,8
Standardabw.	166,2	2205,4	2684,9	369,9	825,6	781,8	520,1
Standardabw. [%]	10,88	11,62	8,13	7,68	12,19	16,81	9,00
Gesamtvolumen	1450	450	700	975	600	650	1900
entnommenes Volumen [μl]	100	100	100	975	600	100	100

Berechnung (Gravimetrie)	BW	1	2	3	4	VB
Blut [g]	1,54093	1,62704	1,61599	1,64117	1,592	1,62432
Erythrocyten lysiert [g]	1,52998	1,57395	1,57333	1,58145	1,54668	
entnommenes Aliquot [g]	0,11517	0,11588	0,11764	0,11022	0,11128	
<i>Faktor (Aliquotierung)</i>	<i>13,2845359</i>	<i>13,5825854</i>	<i>13,3741074</i>	<i>14,3481219</i>	<i>13,8989935</i>	
Gesamtplasma [g]	0,66579	0,71207	0,69791	0,71381	0,68967	
Aliquot Plasma [g]	0,10899	0,10609	0,10822	0,10697	0,10725	
Plasmaprotein [g]	0,07786	0,07983	0,08508	0,08659	0,08879	
<i>Faktor (Bezug auf Gesamtplasma)</i>	<i>6,5504723</i>	<i>7,0182338</i>	<i>6,8015788</i>	<i>7,0125749</i>	<i>6,7324287</i>	
Proteinfreies Plasma [g]	0,02378	0,02163	0,01753	0,0152	0,01365	
<i>Faktor (Bezug auf Gesamtplasma)</i>	<i>6,5504723</i>	<i>7,0182338</i>	<i>6,8015788</i>	<i>7,0125749</i>	<i>6,7324287</i>	
Aceton-Phase [g]	0,48667	0,46868	0,45783	0,4524	0,38871	
Aliquot Aceton-Phase[g]	0,08491	0,08094	0,08197	0,0855	0,08232	
<i>Faktor (Aliquotierung)</i>	<i>5,7315982</i>	<i>5,7904621</i>	<i>5,5853361</i>	<i>5,2912281</i>	<i>4,7219388</i>	
W-Phase [g]	0,4094	0,40409	0,39479	0,40813	0,41321	
Aliquot W-Phase [g]	0,10531	0,10438	0,09453	0,10454	0,10464	
<i>Faktor (Aliquotierung)</i>	<i>3,8875700</i>	<i>3,8713355</i>	<i>4,1763461</i>	<i>3,9040559</i>	<i>3,9488723</i>	

Berechnung

Erythrocyten

Faktorieller Messwert [cpm]	358,68	21120,92	17225,85	22870,91	23211,32
abzüglich BW [cpm]		20762,24	16867,17	22512,22	22852,64
Mittelwert [cpm]		20748,57			
Standardabw.		2744,88			
Standardabw. [%]		13,23			
Quenchung berücksichtigt		153020,68			

Waschlsg. Ery

Faktorieller Messwert [cpm]	112,74	75576,21	65685,57	78737,00	80951,88
abzüglich BW [cpm]		75463,47	65572,83	78624,26	80839,14
Mittelwert [cpm]		75124,93			
Standardabw.		6739,31			
Standardabw. [%]		8,97			
Quenchung berücksichtigt		82637,42			

Plasma

Faktorieller Messwert [cpm]	250,46	223702,34	189155,41	224125,80	230063,62
abzüglich BW [cpm]		223451,88	188904,95	223875,34	229813,17
Mittelwert [cpm]		216511,33			
Standardabw.		18631,97			
Standardabw. [%]		8,61			
Quenchung berücksichtigt		260030,11			

Plasmaprotein

Faktorieller Messwert [cpm]	248,92	47576,61	39013,86	47748,62	52223,45
abzüglich BW [cpm]		47327,69	38764,94	47499,70	51974,53
Mittelwert [cpm]		46391,72			
Standardabw.		5520,85			
Standardabw. [%]		11,90			
Quenchung berücksichtigt		47412,33			

Proteinfreies Plasma

Faktorieller Messwert [cpm]	1201,43	170154,72	152032,39	173169,66	182634,22
abzüglich BW [cpm]		168953,30	150830,96	171968,23	181432,79
Mittelwert [cpm]		168296,32			
Standardabw.		12800,00			
Standardabw. [%]		7,61			
Quenchung berücksichtigt		197074,99			

Thrombocyten

Absolute Verteilung [cpm]	26,00	4338,00	4718,00	5118,00	5101,00
Abs. Verteilung - BW [cpm]		4312,00	4692,00	5092,00	5075,00
Mittelwert [cpm]		4792,75			
Standardabw.		369,90			
Standardabw. [%]		7,72			

	Erythrocyten	Waschlsg. Ery	Plasma	Thrombocyten	Summe (berechnet)
Prozentuale Verteilung [%]	30,57	16,51	51,96	0,96	500480,96
		Gesamtplasma			
		68,47			
		Proteinfreies Plasma	Plasmaprotein		
		75,79	18,23		
Prozentuale Verteilung im Plasma [%]		51,89	12,48		
Prozentuale Verteilung [%]					

R 13

30 µM, 1 h, Spender m/NR

Proben: **Messwerte**

	Erythrocyten	Waschlsg. Ery	Plasma	Thrombocyten	Protein (gefällt)	Proteinfreies Plasma	Vollblut Mittelwert
BW	30	37	44	46	35	30	37
1	1891	19947	34627	4012	4948	4914	9412
2	1922	19109	39297	3455	5395	5465	8386
3	2053	19473	34143	3521	5215	5628	10240
4	1983	19878	34483	3519	5058	5895	
Mittelwert	1962,3	19601,8	35637,5	3626,8	5154,0	5475,5	9346,0
Mittelwert (abzüglich BW)	1932,3	19564,8	35593,5	3580,8	5119,0	5445,5	9309,0
Standardabw.	71,6	389,4	2448,1	258,7	194,5	414,2	928,8
Standardabw. [%]	3,65	1,99	6,87	7,13	3,77	7,56	9,94
Gesamtvolumen	1500	500	600	975	600	650	1900
entnommenes Volumen [µl]	100	100	100	975	600	650	100

Berechnung (Gravimetrie)

	BW	1	2	3	4	VB
Blut [g]	1,53461	1,61954	1,61899	1,6138	1,64112	1,58549
Erythrocyten lysiert [g]	1,55777	1,61582	1,5835	1,59097	1,59644	
entnommenes Aliquot [g]	0,1097	0,11866	0,11564	0,11335	0,11183	
<i>Faktor (Aliquotierung)</i>	<i>14,2002735</i>	<i>13,6172257</i>	<i>13,6933587</i>	<i>14,0359065</i>	<i>14,2755969</i>	
Gesamtplasma [g]	0,64449	0,66859	0,68309	0,67207	0,67922	
Aliquot Plasma [g]	0,1069	0,10684	0,12192	0,10631	0,10693	
Plasmaprotein [g]	0,08288	0,06496	0,07898	0,08973	0,07354	
<i>Faktor (Bezug auf Gesamtplasma)</i>	<i>6,2227479</i>	<i>6,5044265</i>	<i>6,7022174</i>	<i>6,5478371</i>	<i>6,6701365</i>	
Proteinfreies Plasma [g]	0,02069	0,03783	0,02294	0,01291	0,02829	
<i>Faktor (Bezug auf Gesamtplasma)</i>	<i>6,2227479</i>	<i>6,5044265</i>	<i>6,7022174</i>	<i>6,5478371</i>	<i>6,6701365</i>	
Aceton-Phase [g]	0,48916	0,48982	0,46579	0,45181	0,35593	
Aliquot Aceton-Phase [g]	0,08429	0,08137	0,08381	0,08498	0,08396	
<i>Faktor (Aliquotierung)</i>	<i>5,8032981</i>	<i>6,0196633</i>	<i>5,5576900</i>	<i>5,3166627</i>	<i>4,2392806</i>	
W-Phase [g]	0,40389	0,40124	0,42393	0,4247	0,43736	
Aliquot W-Phase [g]	0,10553	0,10473	0,0999	0,10478	0,10552	
<i>Faktor (Aliquotierung)</i>	<i>3,8272529</i>	<i>3,8311850</i>	<i>4,2435435</i>	<i>4,0532544</i>	<i>4,1448067</i>	

Berechnung

Erythrocyten

Faktorieller Messwert [cpm]	426,01	25750,17	26318,64	28815,72	28308,51
abzüglich BW [cpm]		25324,17	25892,63	28389,71	27882,50
Mittelwert [cpm]		26872,25			
Standardabw.		1492,15			
Standardabw. [%]		5,55			
Quenchung berücksichtigt		198182,85			

Waschlsg. Ery

Faktorieller Messwert [cpm]	141,61	76420,65	81089,87	78929,02	82390,47
abzüglich BW [cpm]		76279,04	80948,27	78787,42	82248,86
Mittelwert [cpm]		79565,89			
Standardabw.		2615,26			
Standardabw. [%]		3,29			
Quenchung berücksichtigt		87522,48			

Plasma

Faktorieller Messwert [cpm]	265,27	216691,00	220172,14	215845,04	219036,22
abzüglich BW [cpm]		216425,72	219906,87	215579,77	218770,95
Mittelwert [cpm]		217670,83			
Standardabw.		2011,05			
Standardabw. [%]		0,92			
Quenchung berücksichtigt		261422,66			

Plasmaprotein

Faktorieller Messwert [cpm]	217,80	32183,90	36158,46	34146,97	33737,55
abzüglich BW [cpm]		31966,11	35940,67	33929,17	33519,75
Mittelwert [cpm]		33838,93			
Standardabw.		1636,54			
Standardabw. [%]		4,84			
Quenchung berücksichtigt		34583,38			

Proteinfreies Plasma

Faktorieller Messwert [cpm]	1083,37	192405,00	203564,95	195925,55	(166690,44)
abzüglich BW [cpm]		191321,63	202481,57	194842,17	(165607,07)
Mittelwert [cpm]		196215,13			
Standardabw.		5705,25			
Standardabw. [%]		2,91			
Quenchung berücksichtigt		229767,91			

Thrombocyten

Faktorieller Messwert [cpm]	46,00	4012,00	3455,00	3521,00	3519,00
abzüglich BW [cpm]		3966,00	3409,00	3475,00	3473,00
Mittelwert [cpm]		3580,75			
Standardabw.		284,06			
Standardabw. [%]		7,93			

	Erythrocyten	Waschlsg. Ery	Plasma	Thrombocyten	Summe (berechnet)
Prozentuale Verteilung [%]	35,99	15,89	47,47	0,65	550708,74
		Gesamtplasma			
		63,36			
		Proteinfreies Plasma	Plasmaprotein		
Prozentuale Verteilung im Plasma [%]		105,56	15,89		
Prozentuale Verteilung [%]		66,88	10,07		

R 14

30 µM, 1 h, Spender w/NR

Proben: **Messwerte**

	Erythrocyten	Waschlsg. Ery	Plasma	Thrombocyten	Protein (gefällt)	Proteinfreies Plasma	Vollblut Mittelwert
BW	32	32	38	36	34	35	35
1	2187	21666	35413	4640	4419	5078	6671
2	2020	21670	34960	4343	(5915)	5445	6608
3	2091	21320	34447	4636	4690	5495	6773
4	2175	21256	34867	4833	4561	5363	
Mittelwert	2118,3	21478,0	34921,8	4613,0	4556,7	5345,3	6684,0
Mittelwert (abzüglich BW)	2086,3	21446,0	34883,8	4577,0	4522,7	5310,3	6649,5
Standardabw.	78,2	220,9	396,3	202,1	688,1	186,3	83,3
Standardabw. [%]	3,69	1,03	1,13	4,38	15,10	3,49	1,25
Gesamtvolumen	1400	400	700	975	600	650	1900
entnommenes Volumen [µl]	100	100	100	975	600	100	100

Berechnung (Gravimetrie)	BW	1	2	3	4	VB
Blut [g]	1,56025	1,6204	1,62025	1,62021	1,59136	1,59157
Erythrocyten lysiert [g]	1,52397	1,56782	1,56423	1,56739	1,54687	
entnommenes Aliquot [g]	0,12101	0,12364	0,12674	0,11487	0,12548	
<i>Faktor (Aliquotierung)</i>	<i>12,5937526</i>	<i>12,6805241</i>	<i>12,3420388</i>	<i>13,6449029</i>	<i>12,3276219</i>	
Gesamtplasma [g]	0,66264	0,68315	0,68846	0,67614	0,67951	
Aliquot Plasma [g]	0,10098	0,10681	0,10686	0,10547	0,10534	
Plasmaprotein [g]	0,06718	0,0649	0,0792	0,07062	0,07242	
<i>Faktor (Bezug auf Gesamtplasma)</i>	<i>6,5575458</i>	<i>7,2954934</i>	<i>6,8056544</i>	<i>6,6080923</i>	<i>6,6235501</i>	
Proteinfreies Serum [g]	0,03387	0,02874	0,02196	0,0317	0,03017	
<i>Faktor (Bezug auf Gesamtplasma)</i>	<i>6,5575458</i>	<i>7,2954934</i>	<i>6,8056544</i>	<i>6,6080923</i>	<i>6,6235501</i>	
Aceton-Phase [g]	0,49041	0,47247	0,46353	0,46585	0,46385	
Aliquot Aceton-Phase [g]	0,07734	0,08327	0,08417	0,08404	0,08234	
<i>Faktor (Aliquotierung)</i>	<i>6,3409620</i>	<i>5,6739522</i>	<i>5,5070690</i>	<i>5,5431937</i>	<i>5,6333495</i>	
W-Phase [g]	0,39069	0,38073	0,36531	0,37502	0,36681	
Aliquot W-Phase [g]	0,10546	0,10526	0,1044	0,10493	0,105	
<i>Faktor (Aliquotierung)</i>	<i>3,7046273</i>	<i>3,6170435</i>	<i>3,4991379</i>	<i>3,5740017</i>	<i>3,4934286</i>	

Berechnung

Erythrocyten

Faktorieller Messwert [cpm]	403,00	27732,31	24930,92	28531,49	26812,58
abzüglich BW [cpm]		27329,31	24527,92	28128,49	26409,58
Mittelwert [cpm]		26598,82			
Standardabw.		1548,97			
Standardabw. [%]		5,82			
Quenchung berücksichtigt		196166,32			
Waschlsg. Ery					
Faktorieller Messwert [cpm]	118,55	78366,86	75826,32	76197,72	74256,32
abzüglich BW [cpm]		78248,32	75707,77	76079,17	74137,77
Mittelwert [cpm]		76043,26			
Standardabw.		1693,81			
Standardabw. [%]		2,23			
Quenchung berücksichtigt		83647,58			

Plasma

Faktorieller Messwert [cpm]	249,36	226499,31	225234,53	220830,52	224914,33
abzüglich BW [cpm]		226249,95	224985,17	220581,16	224664,97
Mittelwert [cpm]		224120,31			
Standardabw.		2456,66			
Standardabw. [%]		1,10			
Quenchung berücksichtigt		269168,49			

Plasmaprotein

Faktorieller Messwert [cpm]	222,96	32238,79	(40255,45)	30991,95	30210,01
abzüglich BW [cpm]		32015,83	(40032,49)	30769,00	29987,06
Mittelwert [cpm]		30923,96			
Standardabw.		1023,23			
Standardabw. [%]		3,31			
Quenchung berücksichtigt		31604,29			

Proteinfreies Plasma

Faktorieller Messwert [cpm]	1455,34	210200,16	204074,29	201281,50	200108,40
abzüglich BW [cpm]		208744,82	202618,95	199826,16	198653,06
Mittelwert [cpm]		203729,97			
Standardabw.		4561,95			
Standardabw. [%]		2,24			
Quenchung berücksichtigt		238567,80			

Thrombocyten

Faktorieller Messwert [cpm]	36,00	4640,00	4343,00	4636,00	4833,00
abzüglich BW [cpm]		4604,00	4307,00	4600,00	4797,00
Mittelwert [cpm]		4577,00			
Standardabw.		112,60			
Standardabw. [%]		2,46			

	Erythrocyten	Waschlsg. Ery	Plasma	Thrombocyten	Summe (berechnet)
Prozentuale Verteilung [%]	35,44	15,11	48,63	0,83	553559,40
		Gesamtplasma			
		63,74			
		Proteinfreies Plasma	Plasmaprotein		
Prozentuale Verteilung im Plasma [%]		88,63	11,74		
Prozentuale Verteilung [%]		56,49	7,48		

R 17

30 µM, 1 h, Spender m/NR

Proben: **Messwerte**

	Erythrocyten	Waschlsg. Ery	Plasma	Thrombocyten	Protein (gefällt)	Proteinfreies Plasma	Vollblut
BW	29	41	34	52	47	25	38
1	2101	22130	35343	(4253)	8083	4959	5417
2	2054	22296	34620	3056	(5056)	(3825)	4585
3	2041	22238	36467	3391	7725	5047	4271
4	1924	22336	37017	2819	7754	5106	
Mittelwert	2030,0	22250,0	35861,8	3088,7	7854,0	5037,3	4757,7
Mittelwert (abzüglich BW)	2001,0	22209,0	35827,8	3036,7	7807,0	5012,3	4719,7
Standardabw.	75,2	89,5	1082,0	627,7	1408,4	609,2	592,2
Standardabw. [%]	3,71	0,40	3,02	20,32	17,93	12,09	12,45
Gesamtvolumen	1450	450	600	975	600	650	1900
entnommenes Volumen [µl]	100	100	100	975	600	100	100

Berechnung (Gravimetrie)	BW	1	2	3	4	VB
Blut [g]	1,5362	1,61889	1,63106	1,62793	1,61211	1,56893
Erythrocyten lysiert [g]	1,64048	1,70566	1,707	1,71196	1,70505	
entnommenes Aliquot [g]	0,11262	0,10796	0,11147	0,11232	0,11284	
Faktor (Aliquotierung)	14,5665068	15,7989996	15,3135373	15,2418091	15,1103332	
Gesamtplasma [g]	0,54724	0,57026	0,57608	0,57377	0,56835	
Aliquot Plasma [g]	0,10673	0,10551	0,10647	0,10692	0,10617	
Plasmaprotein [g]	0,06319	0,08579	0,06156	0,07807	0,08051	
Faktor (Bezug auf Gesamtplasma)	5,3217933	5,5039089	7,3329939	5,5324462	5,4923657	
Proteinfreies Serum [g]	0,03964	0,01782	0,017	0,02564	0,02297	
Faktor (Bezug auf Gesamtplasma)	5,3217933	5,5039089	7,3329939	5,5324462	5,4923657	
Aceton-Phase [g]	0,49822	0,45672	0,45498	0,46039	0,45531	
Aliquot Aceton-Phase [g]	0,07853	0,08045	0,08086	0,08199	0,08177	
Faktor (Aliquotierung)	6,3443270	5,6770665	5,6267623	5,6151970	5,5681790	
W-Phase [g]	0,42404	0,41645	0,42272	0,4074	0,4093	
Aliquot W-Phase [g]	0,10519	0,10485	0,11052	0,10356	0,10473	
Faktor (Aliquotierung)	4,0311817	3,9718646	3,8248281	3,9339513	3,9081448	

Berechnung

Erythrocyten

Faktorieller Messwert [cpm]	422,43	33193,70	31454,01	31108,53	29072,28
abzüglich BW [cpm]		32771,27	31031,58	30686,10	28649,85
Mittelwert [cpm]		30784,70			
Standardabw.		1690,63			
Standardabw. [%]		5,49			
Quenchung berücksichtigt		227037,17			
Waschlsg. Ery					
Faktorieller Messwert [cpm]	165,28	87897,36	85278,37	87483,21	87292,32
abzüglich BW [cpm]		87732,08	85113,09	87317,93	87127,04
Mittelwert [cpm]		86822,54			
Standardabw.		1167,28			
Standardabw. [%]		1,34			
Quenchung berücksichtigt		95504,79			

Plasma

Faktorieller Messwert [cpm]	174,33	191021,70	187319,34	195694,64	198159,67
abzüglich BW [cpm]		190847,37	187145,01	195520,31	197985,34
Mittelwert [cpm]		192874,50			
Standardabw.		4832,44			
Standardabw. [%]		2,51			
Quenchung berücksichtigt		231642,28			

Plasmaprotein

Faktorieller Messwert [cpm]	250,12	44488,10	37075,62	42738,15	42587,80
abzüglich BW [cpm]		44237,97	36825,49	42488,02	42337,68
Mittelwert [cpm]		41472,29			
Standardabw.		3215,71			
Standardabw. [%]		7,75			
Quenchung berücksichtigt		42384,68			

Proteinfreies Plasma

Faktorieller Messwert [cpm]	844,08	154949,20	157823,38	156788,97	156154,12
abzüglich BW [cpm]		154105,12	156979,30	155944,89	155310,04
Mittelwert [cpm]		155584,84			
Standardabw.		1202,67			
Standardabw. [%]		0,77			
Quenchung berücksichtigt		182189,84			

Thrombocyten

Faktorieller Messwert [cpm]	52,00	4253,00	3056,00	3391,00	2819,00
abzüglich BW [cpm]		4201,00	3004,00	3339,00	2767,00
Mittelwert [cpm]		3327,75			
Standardabw.		721,87			
Standardabw. [%]		21,69			

	Erythrocyten	Waschlsg. Ery	Plasma	Thrombocyten	Summe (berechnet)
Prozentuale Verteilung [%]	40,72	17,13	41,55	0,60	557511,99
		Gesamtplasma			
		58,68			
		Proteinfreies Plasma	Plasmaprotein		
Prozentuale Verteilung im Plasma [%]		78,65	18,30		
Prozentuale Verteilung [%]		46,15	10,74		

R 15

30 µM, 4 h, Spender w/NR

Proben: **Messwerte**

	Erythrocyten	Waschlsg. Ery	Plasma	Thrombocyten	Protein (gefällt)	Proteinfreies Plasma	Vollblut
BW	34	35	32	48	42	32	Mittelwert 37
1	1886	17418	31269	3372	5767	4872	9590
2	2132	18196	35533	2690	5918	5173	5825
3	1941	16863	32674	3199	5774	4696	6327
4	1776	15429	34576	3267	5861	5348	
Mittelwert	1933,8	16976,5	33513,0	3132,0	5830,0	5022,3	7247,3
Mittelwert (abzüglich BW)	1899,8	16941,5	33481,0	3084,0	5788,0	4990,3	7210,2
Standardabw.	148,9	1167,6	1910,5	303,1	72,6	293,2	2044,3
Standardabw. [%]	7,7	6,9	5,7	9,7	1,2	5,8	28,2
Gesamtvolumen	1500	400	700	975	600	650	1900
entnommenes Volumen [µl]	100	100	100	975	600	100	100

Berechnung (Gravimetrie)	BW	1	2	3	4	VB
Blut [g]	1,56661	1,61485	1,58019	1,60711	1,56743	1,56582
Erythrocyten lysiert [g]	1,56368	1,6019	1,57511	1,58528	1,54421	
entnommenes Aliquot [g]	0,1153	0,10899	0,11134	0,11961	0,11631	
<i>Faktor (Aliquotierung)</i>	<i>13,5618387</i>	<i>14,6976787</i>	<i>14,1468475</i>	<i>13,2537413</i>	<i>13,2766744</i>	
Gesamtplasma [g]	0,66329	0,68049	0,66394	0,69576	0,69012	
Aliquot Plasma [g]	0,10651	0,10228	0,10795	0,10756	0,10756	
Plasmaprotein [g]	0,07686	0,07323	0,06543	0,0822	0,0732	
Faktor (Bezug auf Gesamtplasma)	<i>6,3845413</i>	<i>6,6642836</i>	<i>6,4591886</i>	<i>6,7242679</i>	<i>6,6376839</i>	
Proteinfreies Plasma [g]	0,02703	0,02888	0,03736	0,02127	0,03077	
Faktor (Bezug auf Gesamtplasma)	<i>6,3845413</i>	<i>6,6642836</i>	<i>6,4591886</i>	<i>6,7242679</i>	<i>6,6376839</i>	
Aceton-Phase [g]	0,48944	0,46603	0,46978	0,45515	0,45976	
Aliquot Aceton-Phase [g]	0,08092	0,08274	0,08163	0,07737	0,10484	
<i>Faktor (Aliquotierung)</i>	<i>6,0484429</i>	<i>5,6324631</i>	<i>5,7549920</i>	<i>5,8827711</i>	<i>4,3853491</i>	
W-Phase [g]	0,40076	0,3951	0,40003	0,38971	0,39329	
Aliquot W-Phase [g]	0,10526	0,10584	0,10561	0,10523	0,09143	
<i>Faktor (Aliquotierung)</i>	<i>3,8073342</i>	<i>3,7329932</i>	<i>3,7878042</i>	<i>3,7034116</i>	<i>4,3015422</i>	

Berechnung

Erythrocyten

Faktorieller Messwert [cpm]	461,10	27719,82	30161,08	25725,51	23579,37
abzüglich BW [cpm]		27258,72	29699,98	25264,41	23118,27
Mittelwert [cpm]		26335,34			
Standardabw.		2808,90			
Standardabw. [%]		10,67			
Quenchung berücksichtigt		194223,16			
Waschlsg. Ery					
Faktorieller Messwert [cpm]	133,26	65021,28	68922,88	62450,63	66368,49
abzüglich BW [cpm]		64888,02	68789,63	62317,37	66235,24
Mittelwert [cpm]		65557,56			
Standardabw.		2698,93			
Standardabw. [%]		4,12			
Quenchung berücksichtigt		72113,32			

Plasma

Faktorieller Messwert [cpm]	199,28	208039,13	218543,59	211354,24	221844,45
abzüglich BW [cpm]		207839,85	218344,31	211154,96	221645,17
Mittelwert [cpm]		214746,07			
Standardabw.		6354,44			
Standardabw. [%]		2,96			
Quenchung berücksichtigt		257910,03			

Plasmaprotein

Faktorieller Messwert [cpm]	268,15	38432,92	38225,48	38825,92	38903,47
abzüglich BW [cpm]		38164,77	37957,33	38557,77	38635,31
Mittelwert [cpm]		38328,80			
Standardabw.		322,12			
Standardabw. [%]		0,84			
Quenchung berücksichtigt		39172,03			

Proteinfreies Plasma

Faktorieller Messwert [cpm]	1235,73	182877,01	192293,75	185761,22	155672,59
abzüglich BW [cpm]		181641,28	191058,02	184525,49	154436,86
Mittelwert [cpm]		177915,41			
Standardabw.		16140,49			
Standardabw. [%]		9,07			
Quenchung berücksichtigt		208338,95			

Thrombocyten

Faktorieller Messwert [cpm]	48,00	3372,00	2690,00	3199,00	3267,00
abzüglich BW [cpm]		3324,00	2642,00	3151,00	3219,00
Mittelwert [cpm]		3084,00			
Standardabw.		87,16			
Standardabw. [%]		2,83			

	Erythrocyten	Waschlsg. Ery	Plasma	Thrombocyten	Summe (berechnet)
Prozentuale Verteilung [%]	36,83	13,68	48,91	0,58	527330,52
		Gesamtplasma			
		62,58			
		Proteinfreies Plasma	Plasmaprotein		
Prozentuale Verteilung im Plasma [%]		80,78	15,19		
Prozentuale Verteilung [%]		50,55	9,51		

R 16

30 µM, 4 h, Spender m/NR

Proben: **Messwerte**

	Erythrocyten	Waschlsg. Ery	Plasma	Thrombocyten	Protein (gefällt)	Proteinfreies Plasma	Vollblut Mittelwert
BW	31	25	36	41	63	34	38
1	2276	21324	35467	3656	6804	4203	5962
2	1965	17232	27850	3317	4457	4044	6545
3	2410	23524	38780	(4883)	7439	5655	5439
4	2192	18595	30929	2753	5678	4293	
Mittelwert	2210,8	20168,8	33256,5	3242,0	6094,5	4548,8	5982,0
Mittelwert (abzüglich BW)	2179,8	20143,8	33220,5	3201,0	6031,5	4514,8	5943,7
Standardabw.	186,8	2810,3	4831,9	901,1	1312,2	744,7	451,7
Standardabw. [%]	8,5	13,9	14,5	27,8	21,5	16,4	7,6
Gesamtvolumen	1450	450	700	975	600	650	1900
entnommenes Volumen [µl]	100	100	100	975	600	100	100

Berechnung (Gravimetrie)

	BW	1	2	3	4	VB
Blut [g]	1,54403	1,61348	1,61126	1,61051	1,57599	1,61135
Erythrocyten lysiert [g]	1,63888	1,6958	1,70294	1,6997	1,67241	
entnommenes Aliquot [g]	0,10943	0,10951	0,11188	0,10784	0,10486	
<i>Faktor (Aliquotierung)</i>	<i>14,9765147</i>	<i>15,4853438</i>	<i>15,2211298</i>	<i>15,7613131</i>	<i>15,9489796</i>	
Gesamtplasma [g]	0,5733	0,60434	0,59319	0,59459	0,57899	
Aliquot Plasma [g]	0,1042	0,10632	0,10608	0,10649	0,10909	
Plasmaprotein [g]	0,09073	0,07842	0,07132	0,08333	0,08231	
<i>Faktor (Bezug auf Gesamtplasma)</i>	<i>5,3191687</i>	<i>5,8339608</i>	<i>5,7374021</i>	<i>5,7604146</i>	<i>5,5817025</i>	
Proteinfreies Serum [g]	0,01705	0,02517	0,03207	0,01989	0,02142	
<i>Faktor (Bezug auf Gesamtplasma)</i>	<i>5,3191687</i>	<i>5,8339608</i>	<i>5,7374021</i>	<i>5,7604146</i>	<i>5,5817025</i>	
Aceton-Phase [g]	0,49428	0,47081	0,46455	0,45612	0,44245	
Aliquot Aceton-Phase [g]	0,08196	0,07931	0,08174	0,08312	0,08215	
<i>Faktor (Aliquotierung)</i>	<i>6,0307467</i>	<i>5,9363258</i>	<i>5,6832640</i>	<i>5,4874880</i>	<i>5,3858795</i>	
W-Phase [g]	0,40078	0,38194	0,38245	0,3799	0,39562	
Aliquot W-Phase [g]	0,10587	0,10467	0,10549	0,10464	0,10553	
<i>Faktor (Aliquotierung)</i>	<i>3,7855861</i>	<i>3,6489921</i>	<i>3,6254621</i>	<i>3,6305428</i>	<i>3,7488866</i>	

Berechnung

Erythrocyten

Faktorieller Messwert [cpm]	464,27	35244,64	29909,52	37984,76	34960,16
abzüglich BW [cpm]		34780,37	29445,25	37520,49	34495,89
Mittelwert [cpm]		34060,50			
Standardabw.		3365,51			
Standardabw. [%]		9,88			
Quenchung berücksichtigt		251196,19			

Waschlsg. Ery

Faktorieller Messwert [cpm]	94,64	77811,11	62473,96	85404,89	69710,55
abzüglich BW [cpm]		77716,47	62379,32	85310,25	69615,91
Mittelwert [cpm]		73755,49			
Standardabw.		9929,00			
Standardabw. [%]		13,46			
Quenchung berücksichtigt		81131,04			

Plasma

Faktorieller Messwert [cpm]	198,07	201600,14	155734,74	216529,25	164154,20
abzüglich BW [cpm]		201402,07	155536,67	216331,18	163956,13
Mittelwert [cpm]		184306,51			
Standardabw.		29210,04			
Standardabw. [%]		15,85			
Quenchung berücksichtigt		221352,12			

Plasmaprotein

Faktorieller Messwert [cpm]	335,11	39694,27	25571,60	42851,72	31692,91
abzüglich BW [cpm]		39359,16	25236,49	42516,62	31357,80
Mittelwert [cpm]		34617,52			
Standardabw.		7821,09			
Standardabw. [%]		22,59			
Quenchung berücksichtigt		35379,10			

Proteinfreies Plasma

Faktorieller Messwert [cpm]	1090,67	145559,52	131863,40	178755,72	129057,78
abzüglich BW [cpm]		144468,85	130772,73	177665,04	127967,11
Mittelwert [cpm]		145218,43			
Standardabw.		22800,81			
Standardabw. [%]		15,70			
Quenchung berücksichtigt		170050,79			

Thrombocyten

Absolute Verteilung [cpm]	41,00	3656,00	3317,00	4883,00	2753,00
Abs. Verteilung - BW [cpm]		3615,00	3276,00	4842,00	2712,00
Mittelwert [cpm]		3611,25			
Standardabw.		1069,10			
Standardabw. [%]		29,60			

Prozentuale Verteilung [%] Erythrocyten 45,07 Waschlsg. Ery 14,56 Plasma 39,72 Thrombocyten 0,65 Summe (berechnet) 557290,60

Gesamtplasma 54,28

Proteinfreies Plasma 76,82 Plasmaprotein 15,98

Prozentuale Verteilung im Plasma [%] 41,70 8,68

R 20

30 µM, 6 h, Spender w/NR

Proben: **Messwerte**

	Erythrocyten	Waschlsg. Ery	Plasma	Thrombocyten	Protein (gefällt)	Proteinfreies Plasma	Vollblut Mittelwert
BW	29	20	34	43	53	21	33
1	2275	20894	36250	4252	8750	4562	13290
2	2108	21124	35870	3167	9573	5297	12512
3	2299	20750	36517	4180	8890	5367	9643
4	2158	20582	36447	3554	9420	5394	
Mittelwert	2210,0	20837,5	36271,0	3788,3	9158,3	5155,0	11815,0
Mittelwert (abzüglich BW)	2181,0	20817,5	36237,0	3745,3	9105,3	5134,0	11781,7
Standardabw.	91,7	229,6	290,2	519,4	399,6	397,4	1920,8
Standardabw. [%]	4,15	1,10	0,80	13,71	4,36	7,71	16,26
Gesamtvolumen	1350	450	800	975	600	650	1900
entnommenes Volumen [µl]	100	100	100	975	600	100	100

Berechnung (Gravimetrie)	BW	1	2	3	4	VB
Blut [g]	1,52364	1,63463	1,61678	1,60459	1,63478	1,56969
Erythrocyten lysiert [g]	1,50948	1,58108	1,57357	1,56717	1,5782	
entnommenes Aliquot [g]	0,10986	0,11452	0,11382	0,11034	0,10973	
<i>Faktor (Aliquotierung)</i>	<i>13,7400328</i>	<i>13,8061474</i>	<i>13,8250747</i>	<i>14,2030995</i>	<i>14,3825754</i>	
Gesamtplasma [g]	0,72209	0,74982	0,7472	0,75123	0,77103	
Aliquot Plasma [g]	0,1015	0,10619	0,10654	0,10655	0,10636	
Plasmaprotein [g]	0,07644	0,08242	0,09633	0,09006	0,08938	
<i>Faktor (Bezug auf Gesamtplasma)</i>	<i>6,6022675</i>	<i>7,4839804</i>	<i>6,8663849</i>	<i>6,8838083</i>	<i>7,0736697</i>	
Proteinfreies Serum [g]	0,03293	0,01777	0,01249	0,01907	0,01962	
<i>Faktor (Bezug auf Gesamtplasma)</i>	<i>6,6022675</i>	<i>7,4839804</i>	<i>6,8663849</i>	<i>6,8838083</i>	<i>7,0736697</i>	
Aceton-Phase [g]	0,48258	0,46035	0,44826	0,45099	0,44289	
Aliquot Aceton-Phase [g]	0,08743	0,08482	0,08355	0,08312	0,08284	
<i>Faktor (Aliquotierung)</i>	<i>5,5196157</i>	<i>5,4273756</i>	<i>5,3651706</i>	<i>5,4257700</i>	<i>5,3463303</i>	
W-Phase [g]	0,36854	0,35238	0,35817	0,34609	0,34772	
Aliquot W-Phase [g]	0,10431	0,10451	0,10425	0,10464	0,10498	
<i>Faktor (Aliquotierung)</i>	<i>3,5331224</i>	<i>3,3717348</i>	<i>3,4356835</i>	<i>3,3074350</i>	<i>3,3122500</i>	

Berechnung

Erythrocyten

Faktorieller Messwert [cpm]	398,46	31408,99	29143,26	32652,93	31037,60
abzüglich BW [cpm]		31010,52	28744,80	32254,46	30639,14
Mittelwert [cpm]		30662,23			
Standardabw.		1453,00			
Standardabw. [%]		4,74			
Quenchung berücksichtigt		226133,95			
Waschlsg. Ery					
Faktorieller Messwert [cpm]	70,66	70449,03	72575,38	68629,28	68172,73
abzüglich BW [cpm]		70378,36	72504,71	68558,61	68102,07
Mittelwert [cpm]		69885,94			
Standardabw.		2003,70			
Standardabw. [%]		2,87			
Quenchung berücksichtigt		76874,53			

Plasma

Faktorieller Messwert [cpm]	241,88	255965,49	251568,09	257462,84	264213,34
abzüglich BW [cpm]		255723,60	251326,20	257220,96	263971,45
Mittelwert [cpm]		257060,56			
Standardabw.		5242,66			
Standardabw. [%]		2,04			
Quenchung berücksichtigt		308729,73			

Plasmaprotein

Faktorieller Messwert [cpm]	349,92	65484,83	65731,90	61197,06	66633,97
abzüglich BW [cpm]		65134,91	65381,98	60847,14	66284,05
Mittelwert [cpm]		64412,02			
Standardabw.		2427,36			
Standardabw. [%]		3,77			
Quenchung berücksichtigt		65829,08			

Proteinfreies Plasma

Faktorieller Messwert [cpm]	765,28	185301,02	195137,91	200457,24	203991,23
abzüglich BW [cpm]		184535,74	194372,63	199691,96	203225,95
Mittelwert [cpm]		195456,57			
Standardabw.		8139,23			
Standardabw. [%]		4,16			
Quenchung berücksichtigt		228879,64			

Thrombocyten

Faktorieller Messwert [cpm]	43,00	4252,00	3167,00	4180,00	3554,00
abzüglich BW [cpm]		4209,00	3124,00	4137,00	3511,00
Mittelwert [cpm]		3745,25			
Standardabw.		383,90			
Standardabw. [%]		10,25			

	Erythrocyten	Waschlsg. Ery	Plasma	Thrombocyten	Summe (berechnet)
Prozentuale Verteilung [%]	36,74	12,49	50,16	0,61	615483,46
		Gesamtplasma			
		62,65			
		Proteinfreies Plasma	Plasmaprotein		
Prozentuale Verteilung im Plasma [%]		74,14	21,32		
Prozentuale Verteilung [%]		46,45	13,36		

4.2.2. Versuche mit Auftrennung der Erythrozytenfraktion

R 30

30 µM, 4 h, Spender w/NR

Proben: Messwerte	Erythrocyten	Waschlg. Ery	Plasma	Hämoglobin	Rückstand	Überstand	Plasmaprotein	Proteinfreies Plasma	Vollblut
BW	18	36	34	44	47	49	36	26	36
1	1609	14280	23533	186	218	551	1046	3117	4548
2	1725	15900	25955	421	320	850	1133	3488	4646
3	1584	13718	23376	348	305	681	1049	2579	4496
4	1866	15348	25565	306	267	797	1121	3611	
Mittelwert	1696,0	14811,5	24607,3	315,3	277,5	719,8	1087,3	3198,8	4562,7
Mittelwert (abzüglich BW)	1678,0	14775,5	24573,3	271,3	230,5	670,8	1051,3	3172,8	4526,4
Standardabw.	128,9	991,8	1342,1	98,4	45,5	132,8	46,2	463,5	76,4
Standardabw. [%]	7,60	6,70	5,45	31,21	16,40	18,45	4,25	14,49	1,67
Gesamtvolumen	1500	400	700	500	500	1300	600	600	1900
entnommenes Volumen [µl]	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Berechnung (Gravimetrie)	BW	1	2	3	4	VB			
Blut [g]	1,64415	1,6009	1,58408	1,59597	1,58813	1,56276			
Erythrocyten lysiert [g]	1,09568	1,17994	1,1712	1,16748	1,17293				
entnommenes Aliquot [g]	0,11559	0,11497	0,11287	0,11526	0,11573				
Faktor (Aliquotierung)	9,4790207	10,2630251	10,3765394	10,1290994	10,1350557				
Ery Aliquot [g]	0,10568	0,06597	0,1043	0,10446	0,08783				
Hb [g]	0,08839	0,04235	0,09508	0,08916	0,09001				
Hb gelöst [g]	0,6109	0,56105	0,6129	0,60816	0,60827				
entnommenes Aliquot [g]	0,11887	0,10982	0,10626	0,10907	0,11087				
Faktor (Bezug auf Gesamter):	53,2830151	91,3762997	64,7689065	62,3177790	73,2675318				
Rückstand [g]	1,00802	1,03189	0,98674	0,99505	1,00775				
Rü gelöst [g]	0,09981	0,10134	0,10142	0,10091	0,10103				
entnommenes Aliquot [g]	0,09981	0,10134	0,10142	0,10091	0,10103				
Faktor (Bezug auf Gesamter):	104,70948	182,12349	109,25112	110,20724	133,20842				
Überstand [g]	0,54891	0,65292	0,63675	0,63703	0,63847				
entnommenes Aliquot [g]	0,09397	0,09262	0,093	0,08959	0,08934				
Faktor (Bezug auf Gesamter):	60,5623677	126,0865133	76,8834318	79,4693712	95,4385339				
Gesamtplasma [g]	0,61184	0,63834	0,61756	0,64791	0,63774				
Aliquot [g]	0,108	0,10782	0,10674	0,10687	0,10821				
Faktor (Aliquotierung)	5,6651852	5,9204229	5,7856474	6,0625994	5,8935403				
Plasmaprotein [g]	0,05337	0,0498	0,05025	0,05563	0,04707				
Plasmaprotein gelöst [g]	0,45697	0,45113	0,45072	0,45763	0,45026				
Aliquot [g]	0,10327	0,10074	0,10256	0,09792	0,09603				
Faktor (Bezug auf Gesamtpla):	26,0652111	28,09700883	26,45986478	30,42923533	29,110193				
Proteinfreies Plasma [g]	0,0505	0,05194	0,05232	0,04388	0,05565				
Faktor (Bezug auf Gesamtpla):	5,89043997	6,274228425	6,0208638	6,511003919	6,208528037				
Aceton-Phase [g]	0,50226	0,4886	0,48965	0,61757	0,49047				
Aliquot Aceton-Phase [g]	0,0836	0,08425	0,08707	0,08582	0,08452				
Faktor (Aliquotierung)	6,00789474	5,799406528	5,623636155	7,196108133	5,684690014				
W-Phase [g]	0,39795	0,38356	0,39403	0,38251	0,37944				
Aliquot W-Phase [g]	0,10869	0,10749	0,10769	0,1064	0,10614				
Faktor (Aliquotierung)	3,66133039	3,568331938	3,658928406	3,595018797	3,574901074				
Berechnung	BW	1	2	3	4				
Erythrocyten									
Faktorieller Messwert [cpm]	170,62	16513,21	17899,53	16044,49	18912,01				
abzüglich BW [cpm]		16342,59	17728,91	15873,87	18741,39				
Mittelwert [cpm]		17171,69							
Standardabw.		1309,73							
Standardabw. [%]		7,63							
Quenchung berücksichtigt		169407,89							
Hämoglobin									
Faktorieller Messwert [cpm]	2344,45	16995,99	27267,71	21686,59	22419,86				
abzüglich BW [cpm]		14651,54	24923,26	19342,13	20075,41				
Mittelwert [cpm]		19748,09							
Standardabw.		4204,33							
Standardabw. [%]		21,29							
Quenchung berücksichtigt		21839,31							
Rückstand (Ery)									
Faktorieller Messwert [cpm]	4921,35	39702,92	34960,36	33613,21	35566,65				
abzüglich BW [cpm]		34781,57	30039,01	28691,86	30645,30				
Mittelwert [cpm]		31039,44							
Standardabw.		2624,94							
Standardabw. [%]		8,46							
Quenchung berücksichtigt		41960,80							
Überstand (Hb)									
Faktorieller Messwert [cpm]	2967,56	69473,67	65350,92	54118,64	76064,51				
abzüglich BW [cpm]		66506,11	62383,36	51151,09	73096,96				
Mittelwert [cpm]		63284,38							
Standardabw.		9214,03							
Standardabw. [%]		14,56							
Quenchung berücksichtigt		63284,38							
Waschlg. Ery									
Faktorieller Messwert [cpm]	131,81	50955,78	58176,96	49316,47	54867,58				
abzüglich BW [cpm]		50823,97	58045,15	49184,66	54735,77				
Mittelwert [cpm]		53197,39							
Standardabw.		3983,41							
Standardabw. [%]		7,49							
Plasma									
Faktorieller Messwert [cpm]	192,62	139325,31	150166,48	141719,32	150668,36				
abzüglich BW [cpm]		139132,70	149973,86	141526,71	150475,74				
Mittelwert [cpm]		145277,25							
Standardabw.		5799,56							
Standardabw. [%]		3,99							
Plasmaprotein									
Faktorieller Messwert [cpm]	938,35	29389,47	29979,03	31920,27	32632,53				
abzüglich BW [cpm]		28451,12	29040,68	30981,92	31694,18				
Mittelwert [cpm]		30041,98							
Standardabw.		1543,45							
Standardabw. [%]		5,14							
Proteinfreies Plasma									
Faktorieller Messwert [cpm]	920,12	113417,66	118100,71	120836,18	127445,04				
abzüglich BW [cpm]		112497,54	117180,59	119916,06	126524,92				
Mittelwert [cpm]		119029,78							
Standardabw.		5860,95							
Standardabw. [%]		4,92							
Prozentuale Verteilung [%]	Erythrocyten	Waschlg. Ery	Plasma	Gesamt (berechnet)					
	46,05	14,46	39,49	367883					
		Gesamtplasma							
		53,95							
		Proteinfreies Plasma	Plasmaprotein (gefällt)						
		81,93	20,68						
		44,20	11,16						
	Hb	Rü	Ue						
	12,89	24,77	37,36						
	5,94	11,41	17,20						

R 31
30 µM, 4 h, Spender w/NR

Proben: Messwerte		Erythrocyten	Waschlg. Ery	Plasma	Hämoglobin	Rückstand	Überstand	Plasmaprotein	Proteinfreies Plasma	Vollblut
BW		29	43	33	40	52	39	28	32	37
1		3402	22507	35370	1035	521	1035	2576	4596	5756
2		2744	23242	37453	660	500	1003	2513	4464	6674
3		3217	23084	37107	709	420	1063	2553	5173	5711
4		3325	23533	38050	841	451	1066	2537	4836	
Mittelwert		3172,0	23091,5	36995,0	811,3	473,0	1041,8	2544,8	4767,3	6047,0
Mittelwert (abzüglich BW)		3143,0	23048,5	36962,0	771,3	421,0	1002,8	2516,8	4735,3	6010,0
Standardabw.		295,3	431,8	1151,2	167,6	45,9	29,4	26,5	311,3	543,5
Standardabw. [%]		9,3	1,9	3,1	20,7	9,7	2,8	1,0	6,5	9,0
Gesamtvolumen		1500	400	700	500	500	1300	600	600	1900
entnommenes Volumen [µl]		100	100	100	100	100	100	100	100	100
Berechnung (Gravimetrie)		BW	1	2	3	4	VB			
Blut [g]		1,63837	1,63648	1,6369	1,63542	1,58649	1,51575			
Erythrocyten lysiert [g]		1,29652	1,28766	1,29023	1,2899	1,22609				
entnommenes Aliquot [g]		0,11533	0,11739	0,116	0,11432	0,116				
Faktor (Aliquotierung)		11,241828	10,969077	11,122672	11,283240	10,569741				
Ery Aliquot [g]		0,10547	0,10842	0,1076	0,10711	0,10774				
Hb [g]		0,11154	0,0934	0,08182	0,07589	0,08585				
Hb gelöst [g]		0,62446	0,6085	0,59969	0,59206	0,60219				
entnommenes Aliquot [g]		0,10889	0,10825	0,10909	0,11021	0,10623				
Faktor (Bezug auf Gesamterythrocyten)		70,496394	66,761253	65,916893	64,695004	64,510697				
Rückstand [g]		0,05867	0,06161	0,06278	0,05484	0,05607				
Rü gelöst [g]		0,57552	0,58528	0,58781	0,57676	0,57891				
entnommenes Aliquot [g]		0,10674	0,10818	0,10746	0,10685	0,10847				
Faktor (Bezug auf Gesamterythrocyten)		66,280152	64,255234	65,591113	65,004980	60,736084				
Überstand [g]		0,61626	0,69953	0,71503	0,73955	0,74578				
entnommenes Aliquot [g]		0,09307	0,09113	0,08864	0,08893	0,09433				
Faktor (Bezug auf Gesamterythrocyten)		81,396277	91,166814	96,727370	100,148690	89,971773				
Gesamtplasma [g]		0,5709	0,57147	0,57091	0,57068	0,56321				
Aliquot [g]		0,10704	0,10243	0,10704	0,10724	0,10808				
Faktor (Aliquotierung)		5,333520	5,579127	5,333614	5,321522	5,211047				
Plasmaprotein [g]		0,07995	0,08021	0,09069	0,10349	0,09272				
Protein gelöst [g]		0,50165	0,4978	0,50954	0,51944	0,50707				
Aliquot [g]		0,11053	0,10859	0,10558	0,10744	0,1063				
Faktor (Bezug auf Gesamtplasma)		25,183003	25,267572	26,371274	24,996065	25,967643				
Proteinfreies Serum [g]		0,02294	0,02347	0,01379	0,00689	0,01074				
Faktor (Bezug auf Gesamtplasma)		5,548644	5,511863	5,464299	5,170140	5,443746				
Aceton-Phase [g]		0,47081	0,46295	0,4531	0,43819	0,44552				
Aliquot [g]		0,08334	0,0842	0,08519	0,08759	0,0829				
Faktor (Aliquotierung)		5,649268	5,498219	5,318699	5,002740	5,374186				
W-Phase [g]		0,36178	0,36951	0,36427	0,36832	0,38538				
Aliquot [g]		0,09626	0,10468	0,10549	0,10479	0,10464				
Faktor (Aliquotierung)		3,758363	3,529901	3,453124	3,514839	3,682913				
Berechnung		BW	1	2	3	4				
Erythrocyten										
Faktorieller Messwert [cpm]		326,01	37316,80	30520,61	36298,18	35144,39				
abzüglich BW [cpm]			36990,79	30194,60	35972,17	34818,38				
Mittelwert [cpm]			34493,98							
Standardabw.			3000,50							
Standardabw. [%]			8,70							
Quenchung berücksichtigt			222711,34							
Hämoglobin										
Faktorieller Messwert [cpm]		2819,86	69097,90	43505,15	45868,76	54253,50				
abzüglich BW [cpm]			66278,04	40685,29	43048,90	51433,64				
Mittelwert [cpm]			50361,47							
Standardabw.			11569,92							
Standardabw. [%]			22,97							
Quenchung berücksichtigt			52595,02							
Rückstand (Ery)										
Faktorieller Messwert [cpm]		3446,57	33476,98	32795,56	27302,09	27391,97				
abzüglich BW [cpm]			30030,41	29348,99	23855,52	23945,41				
Mittelwert [cpm]			26795,08							
Standardabw.			3354,17							
Standardabw. [%]			12,52							
Quenchung berücksichtigt			35976,04							
Überstand (Hb)										
Faktorieller Messwert [cpm]		3174,45	94357,65	97017,55	106458,06	95909,91				
abzüglich BW [cpm]			91183,20	93843,10	103283,60	92735,45				
Mittelwert [cpm]			95261,34							
Standardabw.			5458,31							
Standardabw. [%]			5,73							
Quenchung berücksichtigt			95261,34							
Waschlg. Ery										
Faktorieller Messwert [cpm]		161,61	79447,47	80257,50	81136,55	86669,99				
abzüglich BW [cpm]			79285,86	80095,89	80974,94	86508,38				
Mittelwert [cpm]			81716,27							
Standardabw.			3268,35							
Standardabw. [%]			4,00							
Quenchung berücksichtigt			81716,27							
Plasma										
Faktorieller Messwert [cpm]		176,01	197333,73	199759,83	197465,71	198280,35				
abzüglich BW [cpm]			197157,72	199583,82	197289,70	198104,35				
Mittelwert [cpm]			198033,90							
Standardabw.			1114,86							
Standardabw. [%]			0,56							
Quenchung berücksichtigt			198033,90							
Plasmaprotein										
Faktorieller Messwert [cpm]		705,12	65089,26	66271,01	63814,96	65879,91				
abzüglich BW [cpm]			64384,14	65565,89	63109,83	65174,79				
Mittelwert [cpm]			64558,66							
Standardabw.			1083,77							
Standardabw. [%]			1,68							
Quenchung berücksichtigt			64558,66							
Proteinfreies Plasma										
Absolute Verteilung [cpm]		1003,06491	139283,7545	129737,079	133798,941	141480,5859				
Abs. Verteilung - BW [cpm]			138280,6896	128734,014	132795,876	140477,521				
Mittelwert [cpm]			135072,0253							
Standardabw.			5318,713772							
Standardabw. [%]			3,937687141							
Korrigierter Wert			135072,0253							
Prozentuale Verteilung [%]		Erythrocyten	Waschlg. Ery	Plasma	Gesamt (berechnet)					
		44,32	16,26	39,41	502461,51					
		Gesamtplasma								
		55,68								
		Proteinfreies Plasma Protein (gefällt)								
Prozentuale Verteilung im Plasma [%]			68,21	32,60						
Prozentuale Verteilung [%]			37,97	18,15						
		Hb	Rü	Ue						
Prozentuale Verteilung in den Ery [%]			23,62	16,15	42,77					
Prozentuale Verteilung [%]			10,47	7,16	18,96					

R 32
30 µM, 4 h, Spender m/NR

Proben: Messwerte	Erythrocyten	Waschlg. Ery	Plasma	Hämoglobin	Rückstand	Überstand	Plasmaprotein	Proteinfreies Plasma	Vollblut
BW	32	30	31	40	46	36	37	33	27
1	4168	19403	19030	644	579	1098	2119	3657	6935
2	3687	18449	29034	741	703	1031	823	2268	6921
3	3415	17505	48048	353	615	994	1333	2694	7129
4	4098	16731	48992	489	843	1061	1402	4934	
Mittelwert	3842,0	18022,0	36276,0	556,8	685,0	1046,0	1419,3	3388,3	6995,0
Mittelwert (abzüglich BW)	3810,0	17992,0	36245,0	516,8	639,0	1010,0	1382,3	3355,3	6968,0
Standardabw.	355,0	1158,1	14721,3	170,9	117,5	44,2	533,2	1183,0	116,3
Standardabw. [%]	9,24	6,43	40,58	30,70	17,15	4,22	37,57	34,91	1,66
Gesamtvolumen	1500	400	700	500	500	1300	600	600	1900
entnommenes Volumen [µl]	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Berechnung (Gravimetrie)	BW	1	2	3	4	VB			
Blut [g]	1,6538	1,6367	1,6247	1,6331	1,5731	1,6189			
Erythrocyten lysiert [g]	1,2389	1,2225	1,2231	1,2192	1,2099				
entnommenes Aliquot [g]	0,0602	0,0626	0,0649	0,087	0,0677				
Faktor (Aliquotierung)	20,579734	19,528754	18,845917	14,013793	17,871492				
Ery Aliquot [g]	0,1043	0,1002	0,1016	0,1016	0,1003				
Hb [g]	0,1009	0,0973	0,0998	0,077	0,0955				
Hb gelöst [g]	0,4442	0,5433	0,5268	0,5321	0,6032				
entnommenes Aliquot [g]	0,113	0,1041	0,116	0,0737	0,1149				
Faktor (Bezug auf Gesamterythrocyten)	46,693030	63,675171	54,670876	86,637720	63,327136				
Rückstand [g]	0,1043	0,1002	0,1016	0,1016	0,1003				
Rü gelöst [g]	0,4327	0,4296	0,4075	0,4122	0,4213				
entnommenes Aliquot [g]	0,0636	0,0698	0,1114	0,0836	0,1082				
Faktor (Bezug auf Gesamterythrocyten)	80,813092	75,091365	44,036286	59,167464	46,969154				
Überstand [g]	0,5757	0,6726	0,8403	0,7983	0,7741				
entnommenes Aliquot [g]	0,0562	0,0657	0,0696	0,0658	0,066				
Faktor (Bezug auf Gesamterythrocyten)	121,677943	124,902934	145,342753	145,586626	141,482158				
Gesamtplasma [g]	0,6052	0,6138	0,5839	0,5941	0,5917				
Aliquot [g]	0,0577	0,0448	0,0664	0,1072	0,1066				
Faktor (Aliquotierung)	10,488735	13,700893	8,793675	5,541978	5,550657				
Plasmaprotein [g]	0,0604	0,0523	0,0544	0,0608	0,0692				
Protein gelöst [g]	0,3319	0,2921	0,3231	0,3292	0,3471				
Aliquot [g]	0,0784	0,0846	0,0656	0,0673	0,0699				
Faktor (Bezug auf Gesamtplasma)	32,846985	25,781980	81,239704	58,827090	46,935849				
Proteinfreies Serum [g]	0,0176	0,0299	-0,019	-0,0114	-0,0066				
Faktor (Bezug auf Gesamtplasma)	7,758974	7,467153	16,494350	12,026316	9,452077				
Aceton-Phase [g]	0,3058	0,2538	0,3109	0,2784	0,2715				
Aliquot [g]	0,0435	0,0521	0,056	0,0483	0,0602				
Faktor (Aliquotierung)	7,029885	4,871401	5,551786	5,763975	4,509967				
W-Phase [g]	0,3915	0,3777	0,388	0,3843	0,3541				
Aliquot [g]	0,1036	0,0697	0,0763	0,0712	0,0553				
Faktor (Aliquotierung)	3,778958	5,418938	5,085190	5,397472	6,403255				
Berechnung	BW	1	2	3	4				
Erythrocyten									
Faktorieller Messwert [cpm]	658,55	81395,85	69484,90	47857,10	73237,37				
abzüglich BW [cpm]		80737,30	68826,34	47198,55	72578,82				
Mittelwert [cpm]		67335,25							
Standardabw.		14315,72							
Standardabw. [%]		21,26							
Quenchung berücksichtigt		377505,68							
Hämoglobin									
Faktorieller Messwert [cpm]	1867,72	41006,81	40511,12	30583,12	30966,97				
abzüglich BW [cpm]		39139,09	38643,40	28715,39	29099,25				
Mittelwert [cpm]		33899,28							
Standardabw.		5769,90							
Standardabw. [%]		17,02							
Quenchung berücksichtigt		43012,76							
Rückstand (Ery)									
Faktorieller Messwert [cpm]	3717,40	43477,90	30957,51	36387,99	39595,00				
abzüglich BW [cpm]		39760,50	27240,11	32670,59	35877,59				
Mittelwert [cpm]		33887,20							
Standardabw.		5295,32							
Standardabw. [%]		15,63							
Quenchung berücksichtigt		45436,01							
Überstand (Hb)									
Faktorieller Messwert [cpm]	4380,41	137143,42	149848,38	144713,11	150112,57				
abzüglich BW [cpm]		132763,02	145467,97	140332,70	145732,16				
Mittelwert [cpm]		141073,96							
Standardabw.		6072,55							
Standardabw. [%]		4,30							
Quenchung berücksichtigt		141073,96							
Waschlg. Ery									
Faktorieller Messwert [cpm]	113,37	105143,66	93816,67	94482,75	107132,86				
abzüglich BW [cpm]		105030,29	93703,30	94369,38	107019,49				
Mittelwert [cpm]		100030,62							
Standardabw.		6974,37							
Standardabw. [%]		6,97							
Quenchung berücksichtigt		100030,62							
Plasma									
Faktorieller Messwert [cpm]	325,15	260727,99	255315,55	266280,94	271937,77				
abzüglich BW [cpm]		260402,84	254990,40	265955,79	271612,62				
Mittelwert [cpm]		263240,41							
Standardabw.		7154,99							
Standardabw. [%]		2,72							
Quenchung berücksichtigt		263240,41							
Plasmaprotein									
Faktorieller Messwert [cpm]	1215,34	54632,01	66860,28	78416,51	65804,06				
abzüglich BW [cpm]		53416,68	65644,94	77201,17	64588,72				
Mittelwert [cpm]		65212,88							
Standardabw.		9720,18							
Standardabw. [%]		14,91							
Quenchung berücksichtigt		65212,88							
Proteinfreies Plasma									
Absolute Verteilung [cpm]	1799,98	133025,20	207687,79	186746,42	210329,27				
Abs. Verteilung - BW [cpm]		131225,23	205887,81	184946,45	208529,30				
Mittelwert [cpm]		182647,20							
Standardabw.		35867,88							
Standardabw. [%]		19,64							
Korrigierter Wert		182647,20							
Prozentuale Verteilung [%]									
	Erythrozyten	Waschlg. Ery	Plasma		Gesamt (berechnet)				
	50,96	13,50	35,54		740776,706				
		Gesamtplasma							
		49,04							
Serumprotein:									
		Proteinfreies Plasma	Protein (gefällt)						
		69,38	24,77						
Prozentuale Verteilung im Plasma [%]		34,03	12,15						
Prozentuale Verteilung [%]									
	Hb	Rü	Ue						
		11,39	12,04	37,37					
Prozentuale Verteilung in den Ery [%]		5,81	6,13	19,04					
Prozentuale Verteilung [%]									

4.3. Korrekturfaktoren für LSC-Messwerte

Korrekturfaktoren für β -Counter-Messwerte von Blutfraktionen weiblicher Spender

verwendet für alle Messwerte von Proben weiblicher Spender ohne durchgeführte Ery-Auftrennung
je 300 μ l der einzelnen Blutfraktionen werden mit je 2 μ l (9 nCi) 14C-AA-Lsg. dotiert

Proben	Erythrozyten	Waschlsg. Ery	Plasma	Plasmaprotein	Proteinfreies Plasma	H2O-Vgl.	H2O-Vgl. Plasmaprotein
1	1182	9520	8558	25638	8499	8709	26565
2	1326	8744	8992	26558	8446	10100	36727
3	1419	8689	8294	24109	9331	11895	26640
4	1628	10263	8248	27158	8707	10248	26093
Mittelwert	1388,8	9304,0	8523,0	25865,8	8745,8	10238,0	26432,7
Standardabw.	161,9	643,8	295,5	1149,7	351,7		
Standardabw. [%]	11,66	6,92	3,47	4,44	4,02		
β -Counter-Response [%]	13,56	90,88	83,25	97,86	85,42		
Response-Faktor	7,3746	1,1004	1,2012	1,0219	1,1706		

Korrekturfaktoren für β -Counter-Messwerte von Blutfraktionen männlicher Spender

verwendet für alle Messwerte von Proben männlicher Spender ohne durchgeführte Ery-Auftrennung
je 300 μ l der einzelnen Blutfraktionen werden mit je 2 μ l (9 nCi) 14C-AA-Lsg. dotiert

Proben	Erythrozyten	Waschlsg. Ery	Plasma	Plasmaprotein	Proteinfreies Plasma	H2O-Vgl.	H2O-Vgl. Plasmaprotein
1	1022	8377	8070	22851	10432	9038	25385
2	1208	8973	9612	23904	9115	8638	25710
3	995	8910	9439	25400	8761	9049	27580
4	1262	8552	8473	23187	9165	8363	24978
Mittelwert	1121,8	8703,0	8898,5	23835,5	9013,7	8772,0	25913,3
Standardabw.	115,2	247,4	645,9	980,1	220,2		
Standardabw. [%]	10,27	2,84	7,26	4,11	2,44		
β -Counter-Response [%]	12,79	99,21	101,44	91,98	102,75		
Response-Faktor	7,8199	1,0079	0,9858	1,0872	0,9732		

Spender-spezifische Korrekturfaktoren für β -Counter-Messwerte von Blutfraktionen

bestimmt und verwendet für die Messwerte der Fraktionen Hämoglobin, Erythrozyten-Zytosol und Erythrozyten-Fragmente
je 100 μ l der einzelnen Blutfraktionen werden mit je 2 μ l (9 nCi) 14C-AA-Lsg. dotiert

R 30 (weiblich)

	Erythrozyten	Hämoglobin	Rückstand (Ery)	Überstand (Hb)	Waschlsg. Ery	Plasma	Plasmaprotein	Proteinfreies Plasma	Vergleich H2O
1	1652	16029	14531	17332	15595	17483	17663	19222	16149
2	1782	15234	12045	17688	15565	19455	17430	15635	17457
3	1835	15741	11876	18951	17748	15186	17965	17737	20084
Mittelwert	1756	15668	12817,33	17990,3	16302,7	17374,7	17686,0	17531,3	17327,17
Standardabw.	76,88	328,64	1213,71	694,67	1543,61	3018,64	378,30	1486,34	1940,90
Standardabw. [%]	4,38	2,10	9,47	3,86	9,47	17,37	2,14	8,48	11,20
β -Counter-Response [%]	10,14	90,42	73,97	103,83	94,09	100,27	102,07	101,18	
Response-Faktor	9,866	1,106	1,352	0,963	1,063	0,997	0,980	0,988	
	0,44370962	1,896655026	7,004653055	4,009123244	8,908635399	17,421422	2,183289024	8,57808136	

R 31 (weiblich)

	Erythrozyten	Hämoglobin	Rückstand (Ery)	Vergleich H2O
1	2879	15969	11954	16149
2	2345	17282	15166	17457
3	2827	16523	11596	20084
Mittelwert	2684	16591	12905,33	17937,00
Standardabw.	240,41	538,20	1605,20	14328,00
Standardabw. [%]	8,96	3,24	12,44	18008,00
β -Counter-Response [%]	15,49	95,75	74,48	17327,17
Response-Faktor	6,457	1,044	1,343	1940,90
				11,201

R 32 (männlich)

	Erythrozyten	Hämoglobin	Rückstand (Ery)	Vergleich H2O
1	3519	22757	20806	25817
2	6506	24377	19136	27182
3	3937	14557	18438	25277
Mittelwert	4654	20564	19460,00	26092,00
Standardabw.	1320,63	4298,54	993,51	981,82
Standardabw. [%]	28,38	20,90	5,11	3,76
β -Counter-Response [%]	17,84	78,81	74,58	
Response-Faktor	5,606	1,269	1,341	

5. Lebenslauf

PERSÖNLICHES

Daniel Bertow

geboren am 15.06.1977 in Helmstedt

ledig

SCHULAUSBILDUNG

1983-1987 Grundschule Süpplingen

1987-1989 Orientierungsstufe Conringschule Helmstedt

1989-1996 Abitur am Gymnasium am Bötschenberg in Helmstedt

ZIVILDIENTST

1996-1997 Elisabethstift, Sozialpäd. Zentrum der Diakonie

STUDIUM

1997-2002 Studium der Lebensmittelchemie an der Technischen Universität Braunschweig

10/1997 – 09/1999 Grundstudium
14.10.1999 Staatliche Vorprüfung

09/1999- 03/2002 Hauptstudium
07.08.2002 Abschluss des Studienganges Lebensmittelchemie und erste Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker
Wissenschaftliche Abschlussarbeit bei Prof. Dr. Winterhalter: „Polyphenole in Weißwein (Müller-Thurgau)“

04/2002- 03/2003 Beschäftigung am Lebensmittelinstitut Braunschweig

23.04.2003 Zweite Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker

05/2003- 07/2003 Beschäftigung als wissenschaftlicher Angestellter bei Herrn Prof. Dr. Winterhalter, Institut für Lebensmittelchemie, Technische Universität Braunschweig

08/2003- 03/2007 Promotion als wissenschaftlicher Angestellter bei Herrn Prof. Dr. Eisenbrand am Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie, Technische Universität Kaiserslautern: „Molekulare Toxikologie von Acrylamid anhand der Analytik von Proteinaddukten “

seit 04/2007 Beschäftigung bei der Scientific Consulting Company (SCC), Wendelsheim

07-09/2000

Forschungspraktikum in Davis (California, USA)

6. Posterbeiträge und Publikationen

2001

G.R. Takeoka, L. Dao, S. Flessa, D.M. Gillespie, W.T. Jewell, B. Huebner, **D. Bertow**, and S. Ebeler:

Processing Effects on Lycopene Content And Antioxidant Activity of Tomatoes
J. Agric. Food Chem., 49, 3713-3717; epub, doi: 10.1021/jf0102721

2004

Regionaltagung Südwest der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Würzburg, 08.-09.03.:

D. Bertow, M. Baum, T. Spormann, G. Eisenbrand:

Wirkungen von Acrylamid in Humanblut: Nachweis von Acrylamid/Glycidamid-Hämoglobin-Addukten mittels HPLC-Triple-MS, Lebensmittelchemie, 58: 85-86 (2004)

EACR-18, Abstract 164, Innsbruck 3.-6. Juli 2004

D. Bertow, M. Baum, T. Spormann, G. Eisenbrand:

Reaction of acrylamide and glycidamide with human blood components, Proc. Am. Ass. Cancer Res 18; No. 164 (2004)

2005

M. Baum, E. Fauth, S. Fritzen, A. Herrmann, P. Mertes, M. Rudolphi, T. Spormann, H. Zankl, G. Eisenbrand, **D. Bertow**:

Acrylamide and glycidamide: approach towards risk assessment based on biomarker guided dosimetry of genotoxic/mutagenic effects in human blood, Adv Exp Med Biol. 561:77-88 (2005)

2006

DFG Senate Commission on Food Safety (SKLM) Symposium "Thermal processing of food: Potential health benefits and risks", Kaiserslautern 25.-27. September 2005

D. Bertow, M. Baum, G. Eisenbrand:

Dosimetry of acrylamide and glycidamide binding to proteins in human blood, Proceedings of the DFG Senate Commission of Food Safety Symposium "Thermal processing of Food: Potential Health Benefits and Risks", Weinheim, Wiley-VCH, 2007. - XI, 283 S

2007

9. Jahreskongress für Klinische Pharmakologie; Kiel 01-03. November 2007

D. Tomalik-Scharte, O. Doroshenko, D. Kunz, D. Frank, M. Kinzig-Schippers, A. Jetter, Y. Reith, A. Lazar, D. Taubert, J. Kirchheiner, M. Baum, F. Berger, **D. Bertow**, G. Eisenbrand, A. Berkessel, F. Sörgel, E. Schömig, and U. Fuhr:

Role of CYP2E1 and GSTs in the toxicokinetics of acrylamide and its metabolites in humans

2009

O. Doroshenko, U. Fuhr, D. Kunz, D. Frank, M. Kinzig, A. Jetter, Y. Reith, A. Lazar, D. Taubert, J. Kirchheiner, M. Baum, G. Eisenbrand, F. Berger, **D. Bertow**, A. Berkessel, F. Sörgel, E. Schömig, and D. Tomalik-Scharte:

In vivo Role of CYP2E1 and Glutathione-S-Transferase Activity for Acrylamide Toxicokinetics in Humans, Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention, in press (2009)

Am Schluss...

...möchte ich DANKEN,...

...allen, die auf ihre Art zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben und v.a. denen, die ich trotz intensivem Nachdenken in dieser Liste vergessen habe.

...Matthias für die vielen fachlichen Anregungen, die Unterstützung und das vertrauensvolle und freundschaftliche Verhältnis während meiner Promotionszeit.

...dem FEI für die finanzielle Unterstützung für einen wesentlichen Teil dieser Arbeit im Rahmen des FEI-Projektes „Acrylamid in Lebensmitteln – Strategien zur Minimierung“ (FV-Nr. 108 ZGB/1) in Zusammenarbeit mit dem Bund für Lebensmittelrecht und Lebensmittelkunde e.V. unter dem Teilprojekt „Toxikologie von Acrylamid: Konzentrations-Wirkungsbeziehungen von Acrylamid und Glycidamid im Humanblut“.

...der DFG für die finanzielle Unterstützung und Herrn Prof. Dr. med. Fuhr vom Institut für Pharmakologie der Universität zu Köln für die Bereitstellung der Blutproben zur Untersuchung der Hämoglobinaddukte im Rahmen des DFG-Projektes „Bedeutung der CYP2E1-Aktivität für die Toxikokinetik von Acrylamid beim Menschen“ (Studiennummer: KPUK-03-ACR/PIL-01).

...Herrn Stockis für die unermüdliche Bereitschaft mich bei statistischen Fragestellungen zu beraten und meine Ergebnisse mit mathematischen Operationen zu untermauern.

...Karl-Heinz für seine freundliche Unterstützung, fachkompetente Beratung und guten Ideen bei allen Synthesearbeiten.

...dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Zankl, Christoph und Philipp für unzählige Blutabnahmen.

...allen Blutspendern, die sich freiwillig bereit erklärt haben mir eine kleine Menge ihres kostbaren Lebenssaftes zu Forschungszwecken zur Verfügung zu stellen.

...den beiden guten Seelen Heike und Ingrid für die Unterstützung bei allen möglichen kleinen und großen Problemen.

...Ari für die kreativen Lösungsansätze und die tatkräftige Unterstützung bei unzähligen technischen Problemen.

...Rainer für die schönen Abende am Weiher und die Einführung in die Geheimnisse der Töpferkunst.

...den Diplomanden Sebastian und Thomas sowie den Forschungspraktikanten/-innen Nathalie, Tanja, Simone, Georg, Elke und Tobias für alle praktischen Tätigkeiten, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

...Julia, Bülent, Nadine, Tamara, Philipp, Sylvia für die schöne gemeinsame Zeit im Kaffeezimmer und darüber hinaus.

...Nicole, Michael, Melanie und den beiden Sandras für die schöne gemeinsame Zeit bei unzähligen Mensabesuchen.

...Silke für die gemeinsame Zeit als Team-Kollegin, die legendären Auftritte im Kaffeezimmer und die schöne Zeit bei den gemeinsamen Fachtoxikologenkursen.

...Peter für die wunderbaren, unglaublich wichtigen Vorarbeiten bei der Synthese meiner Standardsubstanzen und die vielen lustigen gemeinsamen Tage/Abende.

Am Schluss...

...Yu für die lustige gemeinsame Zeit im und außerhalb des Labors.

...Jochen für die unzähligen Witzchen und Erheiterungen im Labor, dem wahrscheinlich spektakulärsten Floßunfall auf dem Weiher, die Belieferung mit guter Schokolade und die vielen lustigen gemeinsamen Abende.

...Eva für die harmonische, gemeinsame Zeit in einem (eigentlich ihrem) Labor, die vielen schönen und lustigen Fahrten in die nahe und auch ferne Umgebung

...Franz-Ingo für die tatkräftige Unterstützung bei den abschließenden Arbeiten im Labor, die Durchsicht meines Manuskriptes und die überaus lustige Zeit im Labor.

...Sandra für die vielen gemeinsamen, schönen Tage und Abende, die gute Nachbarschaft in Dansenberg, die vielen unglaublich guten und lustigen Gespräche und das Vertrauen.

...Tamara für die wunderbare Freundschaft, die wunderbaren Gespräche und guten Ratschläge in allen Lebenslagen, die gemeinsamen Abenteuer, das tiefgehende Vertrauen und die schönen gemeinsamen Zeiten.

...Phani für die moralische Unterstützung in schwierigen Zeiten, das köstliche indische Essen, die gemeinsamen Abenteuer und die schönen gemeinsamen Zeiten.

Der größte Dank gilt meinen Eltern, dafür dass sie mir das Studium ermöglicht haben, immer an mich geglaubt haben und zu mir gehalten haben in diesen turbulenten, nicht immer einfachen Jahren.